

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

TÍTULO

“IDENTIFICACIÓN DE *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* A PARTIR DE MUESTRAS NASOFARÍNGEAS PRESERVADAS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA, MEDIANTE CULTIVO Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, 2018”

AUTORA DE LA DISERTACIÓN

Saidy Liceth Vásconez Noguera

DIRECTOR

Mtr. José Eduardo Villacís Acuña

QUITO, 2018

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Saidy Liceth Vásconez Noguera, C.I. 1400676498; autora del trabajo de graduación titulado: **“IDENTIFICACIÓN DE *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* A PARTIR DE MUESTRAS NASOFARÍNGEAS PRESERVADAS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA, MEDIANTE CULTIVO Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, 2018”**, previa a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICA CLÍNICA** en la **FACULTAD DE MEDICINA**:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



SAIDY LICETH VÁSCONEZ NOGUERA

C.I. 1400676498

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado sabiduría y fuerza para lograr mis objetivos, por su eterno amor y bondad.

A mis padres, Néstor y Miriam, por su incondicional apoyo, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, quienes a pesar de la distancia siempre fueron mi motivación constante para ser una mejor persona.

A mis hermanos Danilo, Marly y Shary por ser un gran ejemplo de disciplina y esfuerzo, por sus palabras de aliento y siempre cuidar de mí.

A mi novio David, por compartir cada momento de alegría y tristeza, por su paciencia, cariño e infinito apoyo que siempre supo brindarme durante todo este camino.

A mis amigos, por todos los sueños y anhelos que compartimos en esta maravillosa etapa de mi vida.

¡Gracias a ustedes!

Saidy Vásquez N.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR, en especial a la Facultad de Medicina, carrera de BIOQUÍMICA CLÍNICA de la cual me siento muy orgullosa de pertenecer, por su formación humanística y profesional.

Al INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA, de manera especial al Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana por su predisposición y absoluta colaboración para la realización de este trabajo. De la misma manera, mi agradecimiento al Laboratorio de Influenza, a la Dra. Ma. Angélica Becerra y Bq. Ma. José Gallardo por brindarme su confianza y guiarme a través de sus conocimientos en la ejecución del estudio.

Le agradezco a mi director de tesis, Mtr. José Eduardo Villacís por haber confiado en mí e inspirarme perseverancia para alcanzar mis objetivos, por brindarme su valiosa colaboración y orientación para el desarrollo de este trabajo.

Mi gratitud a mis maestros, por encender la imaginación e inspirar amor por el aprendizaje, por su paciencia, amistad y disciplina.

A mis queridos amigos, Christian, Daniela, Andrea, Pamela; en especial a Katherine J. por ser una gran amiga y compañera, por su total apoyo a lo largo de este proyecto.

Saidy Vásquez N.

RESUMEN

Introducción: En los últimos años se ha observado un aumento de la incidencia de tosferina, declarada reemergente por la Organización Mundial de la Salud (OMS). *Bordetella pertussis* es el agente causal de esta enfermedad, que afecta principalmente a población pediátrica no vacunada; mientras que *Bordetella parapertussis* ocasiona un cuadro clínico similar indistinguible de tosferina. A pesar de la alta cobertura de vacunación, pertussis sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, con aproximadamente 140.000 casos reportados anualmente. Aunque *Bordetella pertussis* no requiere un medio de cultivo complejo, resulta difícil de cultivar ya que se ve afectado por una serie de parámetros. Por lo que, el objetivo de este estudio es evaluar el aporte de las distintas metodologías de laboratorio a fin de satisfacer la necesidad de resultados rápidos y de alta especificidad. **Metodología:** En este estudio se analizaron 86 muestras nasofaríngeas, mantenidas en condición de refrigeración, con sospecha de tosferina para su confirmación mediante cultivo, amplificación de genes específicos *IS481* y *ptxA-Pr* para *Bordetella pertussis*, e *IS1001* para *Bordetella parapertussis* por PCR de punto final. Además, se desarrollaron ensayos de PCR en tiempo real a través de las secuencias *IS481* e *IS1001*. **Resultados:** La frecuencia de *Bordetella pertussis* detectada mediante la técnica de PCR de punto final fue del 41%, mayor a la frecuencia registrada por cultivo microbiológico del 23%; mientras que *Bordetella parapertussis* no fue aislada por cultivo, pero mediante las técnicas moleculares se obtuvo un caso de co-infección por ambos microorganismos. El método de PCR de punto final presentó una sensibilidad del 79% y especificidad del 71% para la detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* en comparación con el cultivo, técnica gold estándar. Además, se encontró relación estadísticamente significativa entre la fase de la enfermedad (paroxística) y la detección mediante cultivo desde el día 1 al 15 del inicio de síntomas. **Conclusiones:** Se registró mayor frecuencia de casos sospechosos de tosferina del 65% para el rango de edad de 0 a 3 meses con predominio del sexo masculino. La relación entre la técnica de cultivo y PCR de punto final indica un 41% de aumento en la sensibilidad de la prueba molecular respecto al método gold estándar. Al ser *Bordetella pertussis* un microorganismo de crecimiento lento se necesitan ensayos que no se basen sólo en microorganismos viables y dado que la sensibilidad del cultivo se ve afectado por una serie de factores relacionados al estado de vacunación, tratamiento antibiótico, etapa de la enfermedad, entre otras; es por ello, que la implementación de la técnica molecular de PCR tanto convencional como en tiempo real necesita consolidarse a través de protocolos estandarizados,

que requiere de la amplificación de 4 regiones del genoma *IS481*, *ptxA-Pr*, *IS1001* e *hIS1001* con la finalidad de mejorar la sensibilidad y especificidad diagnóstica.

Palabras claves: tosferina, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, cultivo, PCR.

ABSTRACT

Introduction: In the last few years, an increased incidence of Whooping Cough has been observed, which was declared as a re-emergent disease by the World Health Organization (WHO). The causal agent of this disease is *Bordetella pertussis*; mainly affecting unvaccinated pediatric population; and *Bordetella parapertussis* infection which causes pertussis-like illness. Besides the high coverage of vaccination, *pertussis* remains as a global health problem, with approximately 140,000 new cases reported annual. Despite *Bordetella pertussis* doesn't need a complex culture medium, it is difficult to cultivate because it is affected by some parameters. The aim of this study is to evaluate different laboratory methodologies to detect *Bordetella pertussis* on primary clinical specimens with the purpose of satisfy the necessity of faster results and high specificity. **Methodology:** In this study, 86 nasopharyngeal samples, maintained in a refrigerated condition, were analyzed and confirmed by culture, specific gene amplification: *IS481* and *ptx-A* were the specific genes for *Bordetella pertussis*; *IS1001* was the gene chosen for the detection of *Bordetella parapertussis* using traditional PCR; assays using real-time PCR with the *IS481* and *IS1001* sequences were also performed. **Results:** The frequency of *Bordetella pertussis* with culture methods and phenotypic test was 23% while the frequency using PCR assay was 41%. One case of coinfection was detected using molecular techniques. The sensitivity of PCR assay was 79% and the specificity was 71% for the detection of both *Bordetella pertussis* and *parapertussis*, in comparison with the culture method, gold standard technique. In addition, a statistically significant relationship was found between the paroxysmal phase of the disease and the detection of bacteria by culture in the first 15 days of symptoms. **Conclusions:** A higher frequency of suspected cases of Whooping Cough were registered in the age range from 0-3 months (65%) with predominance in males (55%). The relation between culture method and traditional PCR shows an increase in sensitivity in 41% of the molecular method against culture which is the gold standard; *Bordetella pertussis* is a low growing microorganism, methods that are not only based on living microorganism are required and as the sensitivity of the culture method is affected by some factors related to the state of vaccination, antibiotic treatment, stage of the disease, among others; that is why the implementation of a traditional and real time molecular method needs to consolidate through standardized protocols that requires the amplification of 4 genome regions *IS481*, *ptxA-Pr*, *IS1001* and *hIS1001* in order to improve sensitivity and specificity of molecular diagnosis.

Keywords: Whooping Cough, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, culture, PCR.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	I
AGRADECIMIENTO	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ANEXOS.....	XIII
LISTA DE SIGLAS	XIV
CAPÍTULO I	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	3
1.3 OBJETIVOS	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
CAPÍTULO II	6
2.1 ANTECEDENTES	6
2.2 MARCO TEÓRICO	7
2.2.1 Tosferina y Síndrome Coqueluche	7
2.2.2 Características fenotípicas y genotípicas de <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i>	8
2.2.3 Síntomas clínicos de la tosferina	10
2.2.4 Diagnóstico de laboratorio de tosferina	11
2.2.4.1 Cultivo	12
2.2.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
2.2.4.3 Serología	16
2.2.5 Tratamiento.....	17
2.2.6 <i>Bordetella</i> spp. e infecciones respiratorias agudas en niños	18
2.2.7 Cobertura de la vacunación	19
2.3 MARCO CONCEPTUAL	23
CAPÍTULO III.....	25

3.1	MARCO METODOLÓGICO	25
3.1.1	Tipo de estudio	25
3.1.2	Tipo de muestreo	25
3.1.3	Tamaño de muestra.....	25
3.1.4	Criterios de inclusión.....	26
3.1.5	Criterios de exclusión	26
3.2	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	26
3.3	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	29
3.3.1	Cultivo, aislamiento e identificación microbiológica.....	29
3.3.2	Pruebas moleculares	29
3.4	FASES METODOLÓGICAS.....	31
3.4.1	Fase I. Aprobaciones	31
3.4.2	Fase II. Recolección de datos epidemiológicos y selección de muestras	31
3.4.3	Fase III. Análisis microbiológico e identificación.....	31
3.4.4	Fase IV. Análisis molecular.....	32
3.4.4.1	Extracción de ADN a partir de la suspensión del HNF	32
3.4.4.2	Amplificación de los genes de identificación	32
3.5	CONTROL DE CALIDAD	36
3.5.1	Control de calidad del medio de cultivo Regan Lowe.....	36
3.5.2	Control de calidad de las pruebas microbiológicas de detección de <i>Bordetella</i> spp.....	36
3.5.3	Control de calidad de las técnicas de PCR	36
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS.....	37
CAPÍTULO IV.....		38
4.1	RESULTADOS	38
4.1.1	Datos epidemiológicos de la población en estudio.....	38
4.1.2	Identificación microbiológica.....	39
4.1.3	Identificación genotípica de <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i> ...	41
4.1.4	Identificación genotípica de <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i> mediante PCR en tiempo real	42
4.1.4.1	Amplificación de las curvas estándares para <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i>	42
4.1.4.2	Amplificación de los ADN extraídos de las muestras nasofaríngeas para la detección de <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i>	43

4.1.5	Relación entre la detección de <i>Bordetella pertussis</i> por PCR convencional con la identificación mediante cultivo microbiológico	47
4.1.6	Relación entre el periodo de inicio de síntomas y el diagnóstico mediante cultivo y PCR.....	48
4.1.7	Establecimiento de un algoritmo diagnóstico de laboratorio para la detección de <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i>	49
CAPÍTULO V		53
5.1	DISCUSIÓN	53
5.2	CONCLUSIONES	62
5.3	RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFÍA		65
ANEXOS		75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características bioquímicas útiles para diferenciar las especies de *Bordetella*; **Error! Marcador no definido.**4

Tabla 2. Agentes antimicrobianos para el tratamientos y profilaxis pos exposición para infección por *Bordetella pertussis*; **Error! Marcador no definido.**8

Tabla 3. Tabla de vacunas contra la tosferina disponibles en Ecuador; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 4. Operacionalización de variables; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 5. Secuencias de primers utilizadas para la identificación de las especies de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*.....; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 6. Preparación de Master Mix para los genes IS481, ptxA-PR y IS1001 ; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 7. Programa de termociclado para la amplificación de las secuencias IS481, ptxA-PR y IS1001; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 8. Preparación de Master Mix para la identificación de secuencias especie-específicas de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 9. Programa de termociclado para la amplificación de las secuencias de identificación por PCR en tiempo real.....; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 10. Sensibilidad y especificidad de la PCR convencional frente al cultivo en la detección de *Bordetella* spp.; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 11. Relación del periodo de inicio de síntomas con el diagnóstico mediante cultivo; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 12. Relación del periodo de inicio de síntomas con el diagnóstico mediante PCR convencional; **Error! Marcador no definido.**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de la evolución de la tosferina	11
Figura 2. Representación gráfica del tiempo óptimo para las pruebas diagnósticas por semana	12
Figura 3. Coberturas de vacunación de la pentavalente en Ecuador 2001-2016	21
Figura 4. Frecuencia de casos sospechosos de tosferina con respecto a la institución de salud que notifica.....	38
Figura 5. Representación del porcentaje de pacientes de acuerdo al rango de edades en relación con el sexo.....	39
Figura 6. Estructura morfológica de <i>Bordetella</i> spp.....	40
Figura 7. Representación del porcentaje de casos de acuerdo al sexo en relación con los resultados de cultivo microbiológico.	40
Figura 8. Representación del porcentaje de casos de acuerdo al rango de edad en relación con los resultados de cultivo microbiológico.	41
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 2% de la amplificación de los genes IS481, ptxA-PR e IS1001.	41
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 2% de la amplificación de los genes IS481 e IS1001 en un espécimen del estudio (BP17- 082).....	42
Figura 11. Amplificación de las curvas estándares para <i>Bordetella pertussis</i> , filtro 498-640.	42
Figura 12. Amplificación de las curvas estándares para <i>Bordetella parapertussis</i> , filtro 498-660.....	43
Figura 13. Amplificación del melting peaks para las muestras o controles negativos, en el canal de detección 498-640.	44
Figura 14. Amplificación del control positivo, negativo y estándar 3 para <i>Bordetella pertussis</i> , filtro 498-640.	45
Figura 15. Amplificación del control positivo, negativo y estándar 4 para <i>Bordetella parapertussis</i> , filtro 498-660.	45
Figura 16. Amplificación de la muestra BP17-082 por PCR en tiempo real.....	46

Figura 17. Amplificación de las muestras controles de pacientes sanos y enfermos, muestras no relacionadas, en el canal de detección 498-640.	47
Figura 18. Algoritmo diagnóstico de laboratorio para el estudio de <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i> en casos probables de tosferina.	51
Figura 19. Condiciones de toma, transporte y conservación de muestras para diagnóstico de tosferina.....	52

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprobación del trabajo de investigación por el Comité de Bioética de Investigación en Seres Humanos de la PUCE	76
Anexo 2. Protocolo de microbiología para la identificación de <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella paraptussis</i> mediante cultivo y pruebas microbiológicas	77
Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras nasofaríngeas	78
Anexo 4. Protocolo de amplificación para la detección de <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella paraptussis</i> mediante PCR en tiempo real	81
Anexo 5. Formulario de notificación y cierre de caso EPI 1 individual del MSP (Anverso) .	84
Anexo 6. Modelo de formulario para la vigilancia para tosferina	86
Anexo 7. Experimentos de la amplificación por PCR en tiempo real en el LightCycler 480 II	87

LISTA DE SIGLAS

ANF: Aspirado Nasofaríngeo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATCC: *American Type Culture Collection*

CDC: (*Centers for Disease Control and Prevention*). Centro de Control y Prevención de Enfermedades

Ct: (cycle threshold). Valor umbral

DTaP: Pediatric – Diphtheria-Tetanus-acellular Pertussis vaccine

ECDC: (*European Centre for Disease Prevention and Control*). Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades

HNF: Hisopado Nasofaríngeo

INSPI- CZ9: Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública- Coordinación Zonal 9

PAI: Programa Ampliado de Inmunizaciones

PCR: (*Polimerase Chain Reaction*). Reacción en Cadena de la Polimerasa

PFGE: (Pulsed Field Gel Electrophoresis). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

q-PCR: (*Quantitative Polimerase Chain Reaction*). Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa o en tiempo real

RL: Regan Lowe Agar.

SIVE: Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica del Ecuador

Tdap: Tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Las especies pertenecientes al género *Bordetella* son cocobacilos Gram negativos, aerobios estrictos, no fermentadores de carbohidratos que pueden ser no móviles y motiles en algunas especies (Pfaller et al., 2015). *Bordetella* cuenta con 9 especies, siendo *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella holmesii* consideradas de importancia clínica y que han sido asociadas con infecciones respiratorias en humanos y otros mamíferos (Mooi et al., 2012; Leber, 2014; Sanden & Weyant, 2015).

Las especies patógenas de *Bordetella* son consideradas altamente contagiosas, se transmiten por inhalación de gotas o aerosoles infecciosos de secreciones del tracto respiratorio con una tasa de transmisión del 90% y una dosis infecciosa de alrededor de 100 UFC (Gentile, 2010; Kilgore, Salim, Zervos, & Schmitt, 2016). *Bordetella pertussis* es un patógeno humano estricto, de reservorio animal o ambiental desconocido (Mattoo & Cherry, 2005). En la actualidad este microorganismo es un importante patógeno mundial, que afecta a neonatos, niños y adultos (Kilgore, Salim, Zervos, & Schmitt, 2016). Sin embargo, los niños no inmunizados son el grupo más vulnerable para adquirir la enfermedad, sufrir complicaciones e incluso la muerte (Public Health England, 2016).

Bordetella pertussis es el agente etiológico responsable de la tosferina o tos convulsiva, enfermedad infecciosa aguda que afecta a la vía aérea baja, presente con mayor gravedad en niños menores de un año (Murray, Ronsenthal, & Pfaller, 2014). Por su elevada posibilidad de contagio y distribución universal es considerada una enfermedad de notificación obligatoria (Corres, 2016). En ocasiones, otras especies como *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella holmesii* originan un cuadro clínico similar a tosferina conocido como Síndrome Coqueluchoide, lo que extiende su diagnóstico diferencial y dificulta la confirmación de tosferina (Santos García, 2015).

La OMS ha notificado entre 15. 000 y 34. 000 casos anuales de tosferina a nivel global (WHO, 2012). En el 2014, se reportaron 32. 971 casos de tosferina, lo que representa un incremento del 15 % en comparación con los 28. 639 casos registrados en el 2013 (CDC, 2015). Esta

enfermedad ha aumentado su incidencia en Sudamérica, al duplicar la frecuencia de casos (Faulkner et al., 2011). En el 2012 se notificaron 48. 277 casos de tosferina en Estados Unidos, superando los niveles observados desde 1995 (Torres & L., 2015).

Pese a la introducción de las campañas de vacunación en los años 50, la enfermedad sigue siendo una infección común, con incremento de casos en varios países (Vittucci et al., 2016). En Perú, en el 2012 un estudio reveló que la incidencia de casos de tosferina se encuentra asociada a una inmunidad decreciente inducida por la vacuna y la divergencia genética entre la cepa productora de la vacuna y los aislados de *Bordetella pertussis* (Bailon, León-Janampa, Padilla, & Hozbor, 2016).

Aunque en Ecuador se presentan los registros más bajos de la región, se observa un incremento notable de la enfermedad, un estudio realizado en la provincia de Guayas manifiesta una tasa de prevalencia de casos positivos para *Bordetella pertussis* de 4,34 por cada 100.000 habitantes (Aveiga Suarez, 2015); sin embargo, si se refuerza la captación y el diagnóstico de casos sospechosos de tosferina se obtendría un aumento considerable, siendo la causa más probable la baja cobertura de vacunación en el país (PAI, 2017).

Actualmente, se han notificado nuevos eventos de tosferina por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica del país (SIVE-Alerta), los casos confirmados por laboratorio pertenecen a la provincia de Pichincha y evidencian que el grupo de edad más afectado se encuentra entre 0 a 11 meses. En el año 2015, se han reportado 7 casos confirmados de tosferina, mientras que, en el 2016 se observa un incremento de 14 casos (MSP, 2017).

Debido a la importancia que presenta *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* a nivel clínico, principalmente en población pediátrica y el interés por reforzar la metodología de identificación para dichos microorganismos, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la validez del cultivo microbiológico frente a la PCR convencional para la identificación de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, a partir de muestras nasofaríngeas en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en Quito?

1.2 JUSTIFICACIÓN

La tosferina es una enfermedad causada por la bacteria *Bordetella pertussis*, frecuente en población pediátrica no inmunizada; siendo un problema de salud pública a nivel mundial. La capacidad de adherencia a las células ciliadas del aparato respiratorio y la liberación de toxinas son los mecanismos de patogénesis que presentan dichas bacterias, ocasionando una grave afección respiratoria, pudiendo causar la muerte.

En el Ecuador se dispone de poca información acerca de datos epidemiológicos de la tosferina, debido a la clínica de la enfermedad, uso precoz de antibióticos o inmunización activa, pero la principal causa es la limitación técnica para su detección y estudio.

Motivo por el cual, se han realizado varios estudios destinados a detectar dicho microorganismo responsable de la tosferina a través de pruebas que presenten mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica. Actualmente, en Ecuador existen registros sobre el análisis de la situación epidemiológica de la tosferina en la provincia del Guayas. El Ministerio de Salud Pública mantiene un sistema de vigilancia activo, que consiste en la captación de casos sospechosos de tosferina, la identificación y confirmación mediante cultivo microbiológico y la notificación de tales eventos por parte del laboratorio de referencia.

Debido a la importancia clínica que representan las especies de *Bordetella* en el ser humano; en especial, *Bordetella pertussis*, la falta de información acerca de una posible terapia antimicrobiana administrada a los pacientes y problemas en la calidad de la muestra (toma y transporte), se planteó la necesidad de llevar a cabo el presente estudio de investigación.

En el estudio se pretende evaluar la técnica de PCR convencional para la detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* en comparación con el cultivo microbiológico, a partir de muestras nasofaríngeas. Estos resultados ayudarán a establecer un algoritmo de diagnóstico de laboratorio para la confirmación de tosferina, en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, Dr. Leopoldo Izquieta Pérez –CZ9.

Esta información es relevante porque proporcionará datos de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas empleadas en la detección de dichos microorganismos. Los métodos

de laboratorio serán evaluados y comparados entre sí, con la finalidad de proponer un protocolo destinado a la confirmación de tosferina mediante un diagnóstico rápido, específico y oportuno. Además, permitirán establecer estrategias de control eficientes identificando oportunamente posibles brotes por parte de Ministerio de Salud Pública.

El estudio planteado es viable porque es financiado por el proyecto de investigación convocatoria PUCE 2016/2017 con código M13455 en su totalidad. Además, la presente investigación cuenta con la infraestructura tanto de la Facultad de Medicina, carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE; así como, del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos y del Laboratorio de Influenza del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública –CZ9 para realizar los análisis microbiológicos y moleculares.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* a partir de muestras nasofaríngeas en el INSPI, mediante cultivo microbiológico y técnicas moleculares de PCR.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* a partir de los aislados obtenidos del cultivo microbiológico, mediante pruebas microbiológicas y bioquímicas.
- Detectar la presencia de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* a partir de muestras nasofaríngeas conservadas, mediante técnicas moleculares de PCR.
- Analizar la relación entre la detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* por PCR con la identificación mediante el método de cultivo y pruebas microbiológicas.
- Establecer un algoritmo diagnóstico de laboratorio para detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* a partir de los resultados obtenidos en las pruebas de cultivo y molecular para apoyar al sistema de vigilancia epidemiológica del país.
- Relacionar la presencia de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* con los datos de edad, género y lugar de procedencia como factores predisponentes.

CAPÍTULO II

2.1 ANTECEDENTES

El género *Bordetella* fue descrito en 1906, después de que se creía que el causante de la tosferina era un hongo. Fueron Bordet y Gengou quienes lograron el aislamiento de bacilos pequeños y elipsoidales de la expectoración de niños (Ledermann, 2004). Posteriormente, tras el avance de la biología molecular se reveló que sólo el 50% de la información genética se conserva en todas las especies, de las cuales *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* poseen los genomas más pequeños a diferencia de los otros miembros del género (Pfaller et al., 2015).

En tiempos pasados, las infecciones ocasionadas por *Bordetella pertussis* han sido una causa de morbilidad y mortalidad principalmente en edad escolar. Tras la implementación de la vacunación sistemática de la población, a mediados del siglo XX, se obtuvo un descenso importante en el número de casos de tosferina (Garcia-Martinez, Chaves, Salto, & Otero, 2006).

En la década de los 50, la introducción de la vacuna anti-pertussis de células enteras (WCVs) contribuyó a disminuir la ocurrencia de epidemias por tosferina (van der Zee, Schellekens, & Mooi, 2015). Pero, pese a la disponibilidad de la vacuna contra *Bordetella pertussis*, aún se registran brotes. Además, estudios mostraron que la prevalencia de *Bordetella parapertussis* ha incrementado en los últimos años (Cherry & Seaton, 2012), para lo cual la vacuna anti-pertussis confiere poca o ninguna protección (Heininger et al., 1998).

Esta enfermedad a nivel mundial ha aumentado significativamente en comparación con los años 90 y principios del año 2000 (CDC, 2015). Se ha observado picos significativos de tosferina en los últimos años (WHO, 2012). Se estima entre 50 millones de casos y 300.000 defunciones anuales registradas a nivel global (OMS/PAHO, 2012). La tasa de letalidad en países en vías de desarrollo se encuentra en un 4% en niños menores de 1 año (Pérez-Pérez, Rojas-Mendoza, Cabrera-Gaytán, & Grajales-Muñiz, 2015).

En el 2013, la CDC notificó que los casos de mortalidad atribuida por tosferina se presentaban en niños menores de 6 meses de edad, quienes aún no completaban el esquema básico de vacunación (CDC, 2014).

En Latinoamérica, el número total de casos anuales registrados oscila entre 15.000 y 34.000, en los últimos años (WHO, 2012). En México, en el año 2012 se emitió una alerta epidemiológica debido al comportamiento de casos de tosferina similar a lo observado en otros países de la región, se registraron 455 casos lo que reflejó un aumento del 19% respecto al año 2011 (Pérez-Pérez, Rojas-Mendoza, Cabrera-Gaytán, & Grajales-Muñiz, 2015).

En Venezuela, se presenta un aumento de la incidencia de tosferina, en el 2012 se evidenció un incremento del 21,7% mayor que en el 2011; siendo el grupo etario más susceptible, niños menores de 1 año (Torres, Naranjo, & Suarez, 2015).

En Brasil, en los años 2008 y 2011 se exponen tasas de incidencia de 0,71/ 100.000 habitantes y 1,2/ 100.000 habitantes, respectivamente. Lo que ha sido considerado como epidemia por el sistema de vigilancia epidemiológica del país (Leite et al., 2013). Por otro lado, en Perú, un estudio en el 2012 reveló el aumento de casos de tosferina, donde se evidenció una baja cobertura de vacunación, menor al 50% (Bailon, León-Janampa, Padilla, & Hozbor, 2016).

Actualmente, en Ecuador los casos confirmados por laboratorio con diagnóstico de tosferina revelan que el grupo etario más afectado es el de 0 a 11 meses. Además, a través del sistema de vigilancia del Ministerio de Salud Pública se han captado varios casos de tosferina. En el año 2015 fueron reportados 7 casos, en el 2016 se observó un incremento de 14 casos (MSP, 2017).

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Tosferina y Síndrome Coqueluche

El síndrome Coqueluchoide y la tosferina son consideradas manifestaciones clínicas semejantes, la identificación de *Bordetella pertussis* o *Bordetella parapertussis*, es lo único que permite diferenciarlas (Fernández Cano, Campins Martí, & Armadans, 2016). Sin embargo, el término de Síndrome Coqueluchoide ha sido utilizado para incluir aquellos pacientes que manifiestan signos y síntomas indistinguibles de la tosferina; es decir, cuando no

se conoce el agente etiológico que produce dichas manifestaciones (Gómez Rivera et al., 2011). El signo fundamental del síndrome Coqueluchoide se caracteriza por la afección aguda del tracto respiratorio, que se expresa por accesos de tos repetitiva, tos paroxística o quintosa (González Hermida, Costa Cruz, & Castañeda Álvarez, 2014).

La etiología de la tosferina es *Bordetella pertussis*, un cocobacilo aerobio, Gram negativo, pleomórfico, no móvil y encapsulado (Fernández Cano, Campins Martí, & Armadans, 2016). Mientras tanto, los agentes etiológicos que pueden condicionar el síndrome Coqueluchoide son varios, el más frecuente de origen bacteriano es *Bordetella parapertussis*, pero también se encuentran: *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus Influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Pneumocystis carinii* (Gómez Rivera et al., 2011). Asimismo, puede ser ocasionado por agentes de origen viral, tales como: *Adenovirus*, *Virus Influenzae A y B*, *Virus Parainfluenzae*, *Virus Sincital respiratorio*, *Rinovirus*, *Citomegalovirus*, *Virus de EpsteinBarr* (Mattoo & Cherry, 2005).

Sin embargo, la tosferina y el síndrome Coqueluchoide son infecciones frecuentes y graves en niños menores de 6 meses, pero en el caso específico de la tosferina, es un contexto epidemiológico prevalente que se relaciona con problemas de inmunización, más no de resistencia a los antibióticos (macrólidos) para su tratamiento (Dotres Martínez et al., 2012)

2.2.2 Características fenotípicas y genotípicas de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*

Bordetella spp. es un coco-bacilo Gram negativo, aerobio estricto (Pfaller et al., 2015), su crecimiento óptimo está entre 30 a 37°C (Sanden & Weyant, 2015). Existen varias especies, las de mayor importancia clínica son: *Bordetella pertussis* es un patógeno humano estricto, agente responsable de tosferina (Tille, 2014). *Bordetella parapertussis* responsable de la enfermedad clínicamente similar a la tosferina, conocida como síndrome Coqueluchoide; *Bordetella bronchiseptica* causante de enfermedad respiratoria principalmente en animales como cerdos, perros y de forma ocasional en humanos (Murray, Ronsenthal, & Pfaller, 2014).

Bordetella pertussis, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica* se encuentran estrechamente relacionadas, mientras que *Bordetella holmesii* forma una rama distinta y está más relacionada con *Bordetella avium* (Diavatopoulos et al., 2006). Se cree que un aislamiento de *Bordetella holmesii* es raro en seres humanos; sin embargo, existen ciertos casos de

septicemia en pacientes inmunocomprometidos (Leber, 2014). *Bordetella parapertussis* infecta tanto a humanos como a ovejas; en infantes causa una forma leve de tosferina. Los análisis filogenéticos han demostrado que las cepas de *Bordetella parapertussis* aisladas de humanos son diferentes de las aisladas de las ovejas (Parkhill et al., 2003). Una diferencia entre las especies de *Bordetella*, se caracteriza por la producción de la toxina pertussis secretada por *Bordetella pertussis*; mientras que *Bordetella parapertussis* no la produce; por ello las infecciones a causa de *Bordetella parapertussis* pueden originar una infección no reconocible o una forma leve de tosferina (Bergfors et al., 1999).

Por otro lado, *Bordetella pertussis* está más estrechamente relacionada con cepas de *Bordetella bronchiseptica* preferentemente aisladas de humanos, lo que explica que *Bordetella pertussis* evolucionó a partir de un linaje de *Bordetella bronchiseptica* adaptado al hombre. Tal como se observó en *Bordetella bronchiseptica*, las cepas de *Bordetella parapertussis* forman dos linajes, uno de los cuales se agrupa junto con cepas de *Bordetella bronchiseptica* aisladas de los animales y la otra forma aislada en humanos (van der Zee, Schellekens, & Mooi, 2015).

Básicamente, se conoce que *Bordetella pertussis* es causante de una manifestación más grave de la enfermedad, que lo observado con *Bordetella parapertussis* o *Bordetella holmesii*, mientras que *Bordetella bronchiseptica* se encuentra con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos (Leber, 2014). Estas 3 especies de *Bordetella* expresan en común muchos factores de virulencia como son: adhesinas, fimbrias, hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (Prn), factor de colonización traqueal y citotoxina traqueal; mientras que la toxina pertussis y la proteína de resistencia sérica son expresadas sólo por *Bordetella pertussis*, y el sistema de secreción tipo III por *Bordetella bronchiseptica* (Parkhill et al., 2003).

En los últimos años, se ha evidenciado un resurgimiento de casos de tosferina causados por *Bordetella pertussis*, a pesar de la buena cobertura de vacunación mediante los dos tipos de vacunas disponibles; vacunas de células enteras (WCV) que consisten en bacterias inactivadas y vacunas acelulares (ACV) que presentan entre uno a cinco antígenos bacterianos (Hovingh et al., 2018). Este resurgimiento se ha atribuido a la introducción de una vacuna acelular (Mooi, 2014; Polak, 2017). No obstante, la variación genómica que presenta *Bordetella pertussis* con respecto a la pertactina (Prn) y a la toxina pertussis (Ptx) ha sido descrita desde el uso de la vacuna de células enteras. (He, 2016).

La mayoría de cepas empleadas para la producción de WCV y ACV contiene la ptxA2 o ptxA4 y la prn1 o prn7, mientras que los aislados clínicos circulantes presentan otras variantes como es ptxA1 y prn2 o prn3 (Bart et al, 2014; He, 2016). Además, se han aislado cepas de *Bordetella pertussis* que han perdido la capacidad de producir antígenos como hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (Prn), la subunidad A de Ptx (PtxA), fimbrias de serotipo 2 (Fim2) y fimbrias de serotipo 3 (Fim3), factor de colonización traqueal (TcfA) en países que presentan altas coberturas de vacunación (Polak, 2017). Mientras que en países con baja cobertura de vacunación se ha atribuido la aparición de nuevos casos de tosferina a la presencia de cepas de *Bordetella pertussis* que expresan un nuevo alelo para el promotor de la toxina pertussis, que confiere una mayor producción de toxina (Ptx) (Mooi et al., 2009).

En la actualidad, ya han sido aisladas cepas de *Bordetella pertussis* que no producen Prn, principalmente en países que reportan epidemias de tosferina. En Estados Unidos, durante el brote en el 2012, se registró que más del 60% de sus aislados no producían Prn (Martin et al., 2015). A lo que, estudios indican que las cepas de *Bordetella pertussis* que no producen Prn inducen una respuesta pro inflamatoria más fuerte e incrementan la muerte celular tras la infección (Hovingh et al., 2018). De manera simultánea, *Bordetella pertussis* ha desarrollado mecanismos de adaptabilidad al huésped y evadir la muerte mediada por el complemento, incluida la capacidad de unirse a proteínas reguladoras del mismo (Brookes, 2018).

2.2.3 Síntomas clínicos de la tosferina

La tosferina presenta un periodo de incubación entre 7 a 10 días. La clínica de la enfermedad se encuentra dividida en tres fases: catarral, paroxística y convalecencia. La presentación clínica inicial o etapa catarral es similar a un catarro común; esta etapa se caracteriza por el crecimiento exponencial bacteriano, donde el agente causal aún se desconoce y representa un mayor riesgo de contagio (Murray, Ronsenthal, & Pfaller, 2014).

Después de 1 o 2 semanas evoluciona a la fase paroxística, una serie de toses repetitivas acompañadas de un estridor inspiratorio (WHO, 2008), estos paroxismos podrían terminar con vómito y un estado de agotamiento y persiste por 2 a 6 semanas (Tille, 2014). La última fase o de convalecencia se presenta con la disminución de los síntomas, cuyas complicaciones más comunes se manifiestan con neumonía, convulsiones y encefalitis (Public Health England, 2016).

Las manifestaciones sistémicas tales como fiebre no se evidencian con la infección, pero se expresa leucocitosis con linfocitosis en la mayoría de los niños no vacunados en respuesta a la acción de la toxina pertussis (Mattoo & Cherry, 2005), ver la Figura 1. Además, existen ciertos factores como la edad del paciente, infección reciente, inmunización previa o presencia de anticuerpos adquiridos de forma pasiva y tratamiento con antibióticos, que afectan las manifestaciones clínicas de *Bordetella pertussis* (Heininger et al., 1998).

Lactantes y niños presentan una progresión de los síntomas que va desde la enfermedad asintomática o leve del tracto respiratorio superior a una tos grave, persistente y progresiva que se prolonga durante semanas o meses (Kilgore, Salim, Zervos, & Schmitt, 2016). Sin embargo, la enfermedad clásica se presenta con mayor frecuencia como infección primaria en niños no inmunizados (Mattoo & Cherry, 2005).

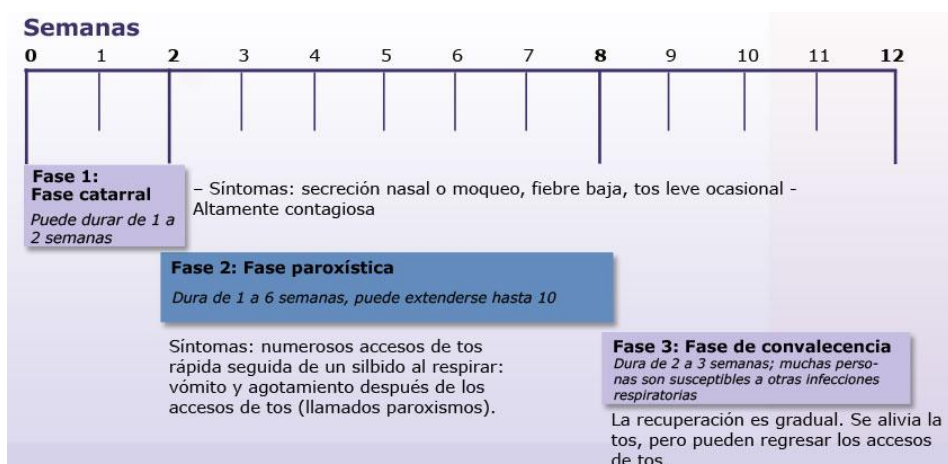


Figura 1. Representación gráfica de la evolución de la tosferina. Adaptado de “Centros para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (2011). *Pertussis* Outbreaks. Disponible en: <http://www.cdc.gov/pertussis/outbreaks.html>.” Copyright 2018.

Aunque la tosferina clásica puede ser diagnosticada confiablemente basándose en los síntomas clínicos, la infección a menudo sigue un curso atípico, ya que se atenúa con inmunidad parcial (Kilgore, Salim, Zervos, & Schmitt, 2016). En este caso, el diagnóstico de clínico tiene que complementar al diagnóstico de laboratorio, ya que el análisis de la tosferina varía por factores como la edad y el grado de inmunidad del paciente (van der Zee, Schellekens, & Mooi, 2015).

2.2.4 Diagnóstico de laboratorio de tosferina

Los métodos empleados con mayor frecuencia para la identificación de *Bordetella pertussis* son el cultivo microbiológico, reacción en cadena de la polimerasa y serología (Ferina, 2011).

Sin embargo, es necesario conocer las limitaciones de las diferentes técnicas para la detección del microorganismo, en relación con la etapa de la enfermedad, como se observa en la Figura 2.

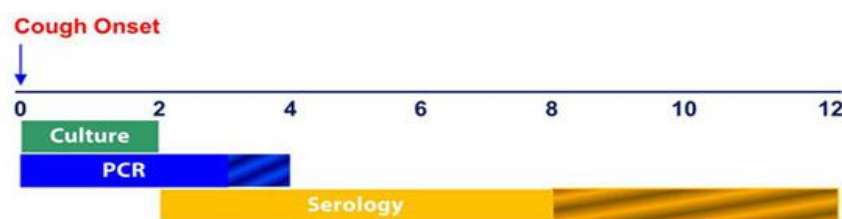


Figura 2. Representación gráfica del tiempo óptimo para las pruebas diagnósticas por semana. Adaptado de “Centers for Disease Control and Prevention, en la sección de National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Bacterial Diseases (2017). Disponible en: <https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/diagnosis-confirmation.html>.” Copyright 2018.

2.2.4.1 Cultivo

El cultivo microbiológico es el método Gold estándar para el diagnóstico de la infección por *Bordetella pertussis* (Dragsted, 2004). Este método convencional se considera altamente específico, pero su sensibilidad es baja, disminuyendo con la duración de la enfermedad y con la edad del paciente (Faulkner et al., 2011). También, es importante recalcar que el cultivo presenta un crecimiento lento, ya que las placas de agar Regan Lowe necesitan ser incubadas durante 4 a 5 días para que *Bordetella* spp. se desarrolle (Dragsted, 2004).

Sin embargo, científicos consideran el cultivo como método de referencia en el diagnóstico de laboratorio de coqueluche (CDC, 2017). Su especificidad es del 100%, pero puede ser negativo en pacientes inmunizados, en los que han comenzado tratamiento antibiótico o en los que llevan más de tres semanas en la evolución de los síntomas (Lavayén et al., 2017).

a) Factores para el desempeño del cultivo

El tipo de muestra clínica requerida para el cultivo de *Bordetella* spp. es el hisopado nasofaríngeo (Mattoo & Cherry, 2005). Aunque en casos graves, *Bordetella pertussis* se puede encontrar en el tracto respiratorio inferior, el sitio de colonización preferido es el tracto respiratorio superior, por lo tanto, las muestras nasofaríngeas son las adecuadas, obtenidas por

aspirado o hisopado. El muestreo de los aspirados se considera complicado y requiere personal calificado, dando un mejor rendimiento que el muestreo habitual mediante hisopados nasofaríngeos (Public Health England, 2016).

Los hisopos de algodón contienen sustancias tóxicas para la bacteria, que afectan a su viabilidad cuando son cultivadas, pero que sí podrían ser utilizados en métodos moleculares, mientras que los hisopos de alginato de calcio son apropiados para el cultivo, pero podrían inhibir la PCR (Cloud, Hymas, & Carroll, 2002).

También pueden utilizarse otro tipo de hisopos en forma de cepillo, útil para mejorar tanto la recogida de muestras como la liberación de especímenes (van der Zee, Schellekens, & Mooi, 2015). Un muestreo nasofaríngeo para el estudio de *Streptococcus pneumoniae* reveló cargas bacterianas más altas mediante PCR cuantitativa (qPCR) cuando se usaron muestras de nylon con cepillo que cuando se usaron muestras de Dacron (Dube, et al, 2013).

El agar Regan-Lowe y Bordet Gengou son los medios indicados para el cultivo de las muestras nasofaríngeas más la adición del antibiótico cefalexina que inhibe el crecimiento de la microbiota del paciente (van der Zee, Schellekens, & Mooi, 2015).

b) Identificación de especies de *Bordetella*

Las especies de *Bordetella* se pueden diferenciar mediante el uso de pruebas bioquímicas como oxidasa, catalasa, reducción de nitrato (urea), además de la tasa de crecimiento en agar MacConkey, como se ilustra en la Tabla 1 (Pfaller et al., 2015).

Tabla 1*Características bioquímicas útiles para diferenciar las especies de Bordetella*

Test	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>
Crecimiento en agar Regan Lowe	+ (3 – 4 días)	+ (2 – 3 días)	+ (1 – 2 días)	ND
Crecimiento en agar MacConkey	-	-	+	CV
Oxidasa	+	-	+	-
Catalasa	+	+	-	-
Urea	-	-	+	-
Motilidad	-	-	+	-

Nota: ND= no determinado, CV= crecimiento variable. Adaptado de “Pfaller, M. A., Richter, S. S., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Carroll, K. C., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition*. American Society of Microbiology. Retrieved from <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381>,” por Saidy Vásquez, 2018.

2.2.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la actualidad, un número significado de infecciones por *Bordetella* spp. son diagnosticadas mediante PCR a partir de muestras nasofaríngeas (Bowden et al., 2014). Según el CDC, la PCR es considerada una prueba diagnóstica rápida y altamente sensible (CDC, 2017).

Los *primers* que han sido ampliamente usados para la identificación de las especies de *Bordetella* son la secuencia de inserción *IS481* sugestivo de *Bordetella pertussis* y la secuencia *IS1001* que se asocia a infección por *Bordetella parapertussis* (Cherry & Seaton, 2012).

Aunque los ensayos a través de la secuencia *IS481* muestran un enfoque altamente sensible, la presencia de gen *IS481* se encuentran en otras especies de *Bordetella*, lo cual compromete su especificidad (Register & Nicholson, 2007). La secuencia *IS481* está presente en el genoma de *Bordetella pertussis* con más de 200 copias (Register, 2006 & Aquino, 2011); sin embargo, se han descrito estudios que demuestran la presencia de un bajo número de copias (8-10 copias/genoma) de la secuencia *IS481* en *Bordetella holmesii* (Reischl, Lehn, Sanden, & Loeffelholz, 2001), lo que compromete el valor predictivo del ensayo molecular basado en dicha secuencia para la diferenciación de especies.

Además, esta secuencia no sólo puede ocasionar falsos positivos con *Bordetella holmesii*, sino que también se ha encontrado en el genoma de *Bordetella bronchiseptica* (0-7 copias/genoma) (Miranda et al., 2013). Por ello, se cuestiona que los laboratorios que emplean la secuencia *IS481* en la PCR erróneamente identifican *Bordetella holmesii* o *Bordetella bronchiseptica* como *Bordetella pertussis* (Riffelmann, et al. & for the Pertussis PCR Consensus Group, 2005).

Si bien, la presentación clínica de *Bordetella holmesii* es muy excepcional, su afección en pacientes inmunocomprometidos tiende a causar bacteriemia, además de la baja susceptibilidad a la eritrocimina que ha sido descrita (Barrado, 2011); por lo que, se recomienda la diferenciación entre ambas especies a través de la secuencia del gen *recA* (Guthrie, 2010). De igual manera, *Bordetella holmesii* presenta otra secuencia denominada *hIS1001*, que es altamente homólogo a la secuencia *IS1001* de *Bordetella parapertussis* (Tatti, Sparks, Boney, & Tondella, 2011). Por tanto, el gen *IS481* e *IS1001* son recomendados como blancos de screening (Martini, Detemmerman, Soetens, Yusuf, & Piérard, 2017). Sin embargo, existen estudios que determinan la prevalencia de *Bordetella parapertussis* a través de la identificación de la secuencia *IS1001* (Tatti, 2008; Zouari, 2012; Qin, 2015).

La PCR ha sido empleada con éxito en la detección de *Bordetella pertussis*, ya que ha mejorado la sensibilidad y especificidad en comparación con las técnicas convencionales (Templeton et al., 2003). Debido a que el aislamiento de *Bordetella pertussis* por cultivo presenta baja sensibilidad y se ve afectado por una serie de factores, incluyendo la edad del paciente, la etapa de vacunación, la duración de la enfermedad, la calidad de la muestra, el medio de transporte y las condiciones de cultivo (Grogan, Logan, O'Leary, Rush, & O'Sullivan, 2011), han despertado el interés de los laboratorios por métodos más rápidos y sensibles para la detección de *Bordetella pertussis* y más de 100 protocolos de PCR se han publicado desde finales de 1980 (van der Zee, Schellekens, & Mooi, 2015).

En cuanto al diagnóstico molecular para las enfermedades infecciosas, como tosferina, tanto la PCR convencional como la PCR en tiempo real presentan ciertas similitudes, tales como: no requieren de microorganismos viables, permite una amplificación exponencial de los productos y demandan los mismos reactivos como dNTPs, primers, buffer, ADN polimerasa y templado (ADN); con la principal diferencia del uso de una sonda fluorescente en la PCR en tiempo real (CDC, 2010), lo cual le proporciona mayor especificidad debido a presencia de 3 oligonucleótidos (2 primers y 1 sonda). Esta técnica además permite la generación de datos

cuantitativos que se producen a medida que avanza la reacción entre el fluorocromo donante (reportero) en el extremo 5' y el fluorocromo aceptor (quencher) en el extremo 3' (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

A lo que, la PCR en tiempo real es considerada una variación de la PCR convencional que permite la cuantificación del ADN de una muestra usando primers y sondas fluorescentes (Kubista et al, 2006). Este ensayo se considera seguro, debido a que sin unión al blanco no se producirá amplificación ni señal de fluorescencia, principalmente si se emplean sondas TaqMan, lo que incrementa la especificidad (Aguilera, 2014).

Desde el 2007, la Organización Mundial de la Salud en colaboración con el CDC han recomendado que la técnica adecuada para realizar el diagnóstico de tosferina, causada por *Bordetella pertussis* sea la PCR en tiempo real debido a la alta sensibilidad y especificidad (Montilla-Escudero, Rojas-Baquero, & Ulloa-Virguez, 2016).

Sin embargo, la especificidad de la PCR varía, por ello se recomienda confirmar mediante cultivo al menos un caso sospechoso si existe sospecha de brote de tosferina (CDC, 2017). La toma de muestra nasofaríngea se debe realizar hasta la tercera o cuarta semana del inicio de los síntomas, pasado este tiempo, la cantidad de ADN bacteriano empieza a disminuir e incrementa el riesgo de obtener falsos negativos (Grogan, Logan, O'Leary, Rush, & O'Sullivan, 2011). De la misma manera, se debe tener en cuenta que dado la alta sensibilidad de la prueba existe riesgo de obtener resultados falsamente positivos, pero una buena práctica de laboratorio ayuda a reducir dicho riesgo (CDC, 2017).

En la mayoría de comparaciones entre el cultivo y la PCR, la utilidad diagnóstica ha incrementado aproximadamente 2 a 4 veces mediante el uso de PCR en tiempo real (ECDC, 2012). En definitiva, la introducción de este método de diagnóstico molecular para la detección rutinaria de *Bordetella pertussis* ha dado como resultado un incremento del 91% en la detección del microorganismo en comparación con el cultivo microbiológico (Grogan, Logan, O'Leary, Rush, & O'Sullivan, 2011).

2.2.4.3 Serología

Las pruebas serológicas son recomendadas para el diagnóstico en etapas tardías de la enfermedad. Según el CDC, el momento adecuado para la toma de muestra es a partir de las 2

a 8 semanas después del inicio de los síntomas, cuando se presenta el título más alto de anticuerpos (CDC, 2017). Sin embargo, existen problemas asociados al diagnóstico serológico tales como la interferencia de vacunas o infecciones previas, reactividad cruzada con otras especies de *Bordetella* o incluso otras bacterias y la respuesta variable de los antígenos de *Bordetella pertussis* (van der Zee, Schellekens, & Mooi, 2015).

2.2.5 Tratamiento

El tratamiento antimicrobiano empleado para combatir la infección deberá tomar las siguientes consideraciones como edad, eventos adversos propios del fármaco, tolerabilidad y costos (Kilgore, Salim, Zervos, & Schmitt, 2016). La administración de macrólidos en la etapa temprana de la enfermedad puede reducir la duración y la severidad de los síntomas (Tiwari, Murphy, Moran, & others, 2005). Azitromicina, eritromicina y claritromicina son los fármacos recomendados por el CDC para el tratamiento de tosferina (CDC, 2015).

La azitromicina es el medicamento comúnmente empleado debido al corto tiempo de administración, una dosis diaria durante 5 días. Este es el antimicrobiano de preferencia usado en niños menores de 1 mes (Faulkner et al., 2011). Por otro lado, para niños ≥ 2 meses el antibiótico alternativo en caso de intolerancia o resistencia a macrólidos es el trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMZ) (Tiwari, Murphy, Moran, & others, 2005).

En el 2007, la revisión del estudio Cochrane respecto a los antibióticos para tosferina reveló que, si bien estos son efectivos contra la enfermedad, no alteran la clínica posterior de la misma (Altunaiji, Kukuruzovic, Curtis, & Massie, 2007). Estos antibióticos ofrecen las ventajas de mejor absorción, semi-vida más larga, adecuada actividad in vitro contra *Bordetella pertussis* y menos efectos adversos (Dierig, Beckmann, & Heininger, 2015) (Public Health England, 2016).

En la Tabla 2 se exponen los agentes antimicrobianos para el tratamiento y profilaxis pos exposición para infección por *Bordetella pertussis*, entre el año 1997 al 2013.

Tabla 2

Agentes antimicrobianos para el tratamientos y profilaxis pos exposición para infección por Bordetella pertussis

Agente antimicrobiano	Grupo de edad	Dosis	Comentarios
Eritromicina	>1 mes	40–60 mg/kg/día en 3 o 4 dosis por 7 a 14 días.	Incrementa el riesgo de Estenosis pilórica hipertrófica infantil en neonatos.
	Adultos	500 mg cada 6 u 8 horas durante 7 a 14 días	
Azitromicina	<6 meses	10 mg/kg/día por 5 días.	Se recomienda administrar 1 hora antes o 2 horas después del consumo de alimentos y antiácidos. Categoría B de drogas en el embarazo, según FDA
	≥6 meses	10 mg/kg el primer día, seguido de 5 mg/kg en los días 2-5.	
	Adultos	500 mg en el día 1, seguido de 250 mg en los días 2-5	
Claritromicina	>1 mes	15 mg/kg/día en 2 dosis divididas por 7 días	Moderadamente tolerado, el trastorno gastrointestinal es común.
	Adultos	500 mg cada 12 horas durante 7 días	Categoría C de drogas en el embarazo, según FDA
Trimetoprim (TMP) sulfametoxazol (SMZ)	>2 meses	8 mg/kg/día de TMP más 40 mg/kg/día de SMZ cada 12 horas por 14 días.	Es considerado tratamiento de segunda línea en caso de intolerancia o resistencia a los macrólidos; Categoría C de drogas en el embarazo, según FDA
	Adultos	320 mg/día de TMP más 1600 mg/día de SMZ cada 12 horas durante 14 días.	Contraindicado en embarazadas y madres lactantes

Nota: TMP= Trimetoprim, SMZ= Sulfametoxazol. Adaptado de “Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J., & Schmitt, H.-J. (2016). *Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention*. Clinical Microbiology Reviews, 29(3), 449–486. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>,” por Saidy Vásquez, 2018.

2.2.6 Bordetella spp. e infecciones respiratorias agudas en niños

Las infecciones respiratorias agudas (IRA's) se consideran un importante problema de salud, principalmente en niños menores de 5 años (Reyes, 2016). Por lo general, estas infecciones son adquiridas por pacientes que presentan ciertos factores de riesgo; es decir, algún rasgo,

característica o exposición de la persona que incremente su probabilidad de padecer una enfermedad o lesión (WHO, 2016).

Los microorganismos causantes de este tipo de infecciones pueden ser virus, bacterias, hongos e incluso parásitos, de los cuales el de origen viral es el más común (Ovalles & Velásquez, 2015). Los diversos agentes infecciosos responsables de neumonía en niños son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* de tipo b, El virus sincitial respiratorio y *Pneumocystis jiroveci* en inmunodeprimidos (WHO, 2016).

El virus sincitial respiratorio (VSR) es el agente etiológico más frecuente de infección viral del tracto respiratorio en lactantes y niños (van Woensel et al., 2003). Este hecho ha provocado dificultad entre el diagnóstico de una infección causada por *Bordetella pertussis* y una infección a causa del VSR, dado a que la distribución de edad es similar en ambas enfermedades (Grogan, Logan, O’Leary, Rush, & O’Sullivan, 2011).

Cabe mencionar que algunos de los microorganismos responsables de IRA’s son inmunoprevenibles, por lo que la vacunación es la estrategia preventiva más efectiva en el control de la transmisión (Cardona, Segura, Garzón, Calle, & Agudelo, 2016). Sin embargo, es importante emplear un adecuado diagnóstico de laboratorio que permita discernir en casos de co-infección, con la finalidad de evitar que la enfermedad sea sub diagnosticada (Moreno Samos et al., 2015).

2.2.7 Cobertura de la vacunación

En Estados Unidos, la vacuna de trivalente DPT (difteria, tosferina y tétanos) fue autorizada por primera vez en 1914, para la inmunización infantil desde 1948 (Guris et al., 1997). La vacuna de *pertussis* de células enteras fue administrada en combinación con difteria y los toxoides *tetanus* (Kendrick & Eldering, 1936). Esta vacuna consistía en una suspensión de la bacteria *Bordetella pertussis* inactivada, la cual generaba inmunidad de tipo humoral contra tosferina tras la administración intramuscular (Baptista, Magalhães, Rodrigues, Rocha, & Pimentel, 2005; WHO, 2010).

Actualmente, la OMS recomienda campañas de vacunación en niños contra una serie de enfermedades infecciosas, tales como difteria, tétanos, tosferina, hepatitis B, poliomielitis e infecciones invasivas ocasionadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (WHO, 2012; Expósito

et al., 2015). Hoy en día, existen 2 tipos de vacunas que ayudan a proteger contra la tosferina: la vacuna difteria, tétanos y pertussis acelular (DTap) y la vacuna tétanos, difteria y pertussis acelular (Tdap). La vacuna DTap se administra a lactantes y niños menores de 7 años; mientras que niños mayores de 7 años, adolescentes y adultos reciben la vacuna Tdap (CDC, 2017).

El control de la enfermedad se basa en la alta cobertura de inmunización, siendo el pilar en la prevención de la enfermedad (WHO, 2008). La vacunación contra tosferina es recomendada a población en riesgo como bebés y niños, preadolescentes y adolescentes y mujeres embarazadas, convirtiéndose en la estrategia preventiva más importante contra la tosferina (NCIRD, 2017).

Sin embargo, la distribución no homogénea de la vacunación, la poca duración de la inmunidad adquirida por las vacunas (Tan, Trindade, & Skowronski, 2005), la manifestación de síntomas clínicos atípicos y aparición de nuevas variantes antigénicas de *Bordetella pertussis* han contribuido a la presentación de un nuevo perfil epidemiológico (Lavayén et al., 2017).

Además, se ha demostrado que las vacunas acelulares son menos efectivas que las vacunas celulares, pues sólo previenen la enfermedad y no la infección (Moraga-Llop & Campins-Martí, 2015). Es importante denotar que en países donde la cobertura es moderada o baja, la vigilancia debería monitorear la captación de los casos, mejorar la cobertura de vacunación y de este modo disminuir la incidencia de la enfermedad en la región (Audi, Wapstra, & Thibault, 2003).

2.2.8 Situación epidemiológica de la tosferina en el Ecuador

La tosferina pertenece al grupo de las enfermedades inmunoprevenibles cuyo código en la clasificación CIE-10 es A37.0-A37.9 (PAHO, 2016). La notificación e investigación de los eventos de tosferina están sujetos a vigilancia y a través de la gaceta epidemiológica que maneja el SIVE-Alerta se exhiben datos desde el 2013, donde reportan 46 casos de tosferina, de los cuales, 7 fueron confirmados por nexo epidemiológico, 4 por clínico epidemiológico y 35 por laboratorio. La situación del año 2014 hasta la SE 52 se han reportado únicamente 10 casos de tosferina; mientras que, en el 2015, los casos reportados fueron 9. En el 2016, fueron 12 casos confirmados, con mayor número de casos notificados en la provincia de Pichincha.

En Ecuador, la creación del Programa Ampliado de Inmunizaciones inició en el año 1977 con 4 biológicos: BCG, OPV, DPT y AS, ya en el año 2003 se introdujo la vacuna pentavalente

(DPT+HB+Hib) al esquema de vacunación. Las coberturas de vacunación de la pentavalente desde 2001 al 2009 superaban el 100%; mientras que a partir del 2009 al 2016 se observa un descenso paulatino al 82%, como se observa en la Figura 3.

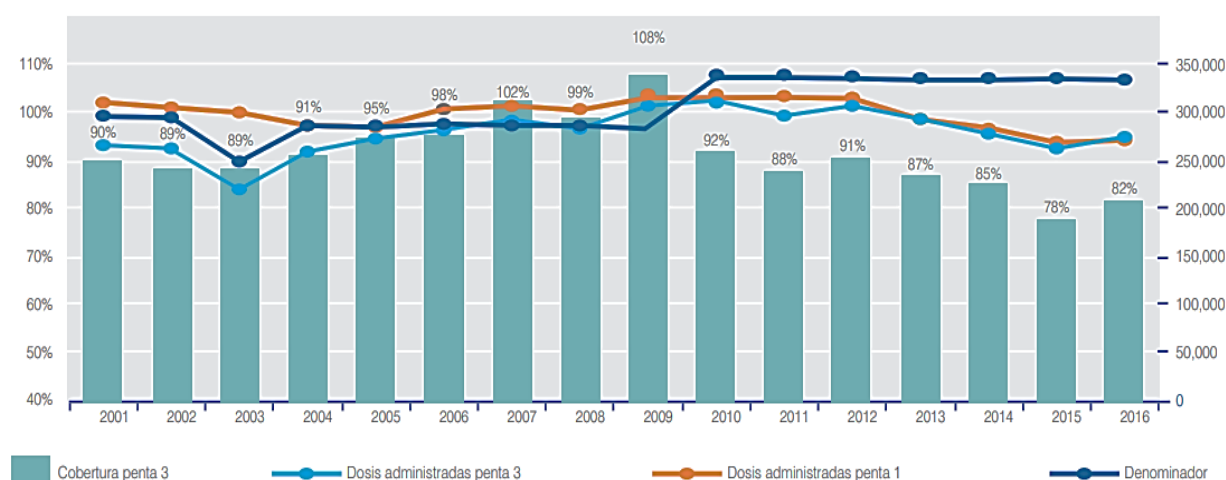


Figura 3. Coberturas de vacunación de la pentavalente en Ecuador 2001-2016. Adaptado de “Ministerio de Salud Pública. Evaluación de la Estrategia Nacional de Inmunizaciones Ecuador (2017). MSP-SCI-PAI-ENI. Edición: Quito-Ecuador.” Copyright 2018.

Actualmente, el PAI aplica la vacuna pentavalente DPT+HB+Hib que se encuentra dentro del esquema de vacunación familiar en menores de 1 año de edad, administrada en 3 dosis a los 2, 4 y 6 meses de edad por vía intramuscular. Se recomienda que después de un año de la 3ra dosis, se aplique una 4ta dosis de la vacuna trivalente DPT, como primer refuerzo de la pentavalente (MSP, 2016).

La Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), realiza la liberación de los medicamentos biológicos para uso y consumo humano, dentro del cual se encuentran las vacunas de fabricación nacional o importadas. Además, de las vacunas que ingresan por el PAI y que son precalificadas por la OPS. En la base de datos de los lotes de medicamentos biológicos del 2017, se han encontrado 6 productos liberados correspondiente a la vacuna contra tosferina, como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3*Tabla de vacunas contra la tosferina disponibles en Ecuador*

Solicitante	Nombre del Producto	Forma Farmacéutica	Presentación	Fabricante	Fecha de Vencimiento	No. Lote	Tamaño de dosis
MSP (PAI)	Difteria, Tétanos, Tosferina (células enteras), Hepatitis B (rDNA) y Haemophilus influenzae tipo b Vacuna conjugada (adsorbida) IP	Suspensión inyectable	Vial de dosis única que contiene 0,5 ml de vacuna	PANACEA BIOTEC LTD.	2018-07	ESV016049	145.351
MSP (PAI)	Vacuna adsorbida antidiftérica, antitetánica y contra la tosferina	Solución inyectable	vial de 5 ml por 10 dosis	Serum Institute of India PVT.LTD	2018-10	282P6014	120000
MSP (PAI)	EUPENTA™ Inyectable	Suspensión Inyectable	Dosis simple 0.5 ml / ampolla x 10 ampollas	LG Chem	2019-10-20	FWL16510	54.880
MSP (PAI)	EUPENTA™	Suspensión inyectable	Dosis simple 0.5 mL / ampolla x 10 ampollas	LG Chem	5/3/2020	FWL17511	2.660
GLAXOSMIT HKLINE ECUADOR S.A.	Boostrix ® (Vacuna contra la difteria, tétano y pertussis acelular)	Suspensión inyectable	Caja + jeringa prellenada x 0.5 ml + 2 agujas + prospecto	GlaxoSmithKline Biologicals S.A.	2019-08	AC37B262AM	1.000
MSP (PAI)	EUPENTA™ Inyectable [Vacuna Conjugada contra Difteria adsorbida-Tétanos-Tosferina-Hepatitis B (rDNA) y Haemophilus influenzae tipo b]	Suspensión inyectable	Dosis simple 0.5 mL/ampolla x 10 ampolla	LG Chem	13/2/2020	FWL17510	34.730

Fuente: Adaptado de “Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (2016). Liberación de medicamentos biológicos,” por Saidy Vásquez, 2018.

2.3 MARCO CONCEPTUAL

Background: Son niveles de señal de fluorescencia mientras ocurren los primeros ciclos; conocido como ruido, debido que no sobrepasa el umbral (Chirinos, 2015).

Co-infección: Es una situación en que 2 o más microorganismos coexisten en un mismo huésped (WHO, 2013).

Ct (cycle threshold, valor umbral): Es el número de ciclos de PCR en el cual la fluorescencia medida por el instrumento está a un nivel estadísticamente por encima del “background”, punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo, es conocido como Cp (“Crossing point”) (Rebrikov & Trofimov, 2006).

Curva de amplificación: Es una gráfica que muestra el ciclo de amplificación en el eje de X versus las unidades de fluorescencia en el eje de Y para cada reacción (Chirinos, 2015).

Curvas de calibración: Son curvas altamente reproducibles que permiten la generación de datos altamente específicos y sensibles, la precisión de la cuantificación absoluta en PCR en tiempo real depende completamente de la precisión de los estándares (Pfaffl, 2004).

Curva de melting o curva de denaturación: Son curvas que ayudan en el análisis post-PCR para discriminar entre negativo y positivo (Chirinos, 2015). Además, el análisis de melting monitorea la hibridación dúplex a medida que cambia la temperatura (Pryor, 2006).

DPT/ Trivalente: Es la vacuna contra difteria, tétanos y tosferina (antitosferínica de células enteras, wP), que proporciona inmunidad durante el primer año de vida frente a la infección. (Pan American Health Organization, 2005).

Enfermedad inmunoprevenible: Es aquella enfermedad que se puede prevenir mediante la administración de una vacuna (MSP, 2013).

Fluorocromo acceptor (quencher): Es el encargado de absorber la emisión de energía del fluoróforo excitado (Rebrikov & Trofimov, 2006).

Fluorocromo reportero (fluoróforo): Es un fluoróforo que se usa para monitorear la hidrólisis de la sonda y es proporcional a la acumulación del producto de PCR (Rebrikov & Trofimov, 2006).

Niño susceptible: Se considera a todo niño menor de 5 años que no ha sido adecuadamente vacunado o que no ha desarrollado anticuerpos frente al antígeno vacunal (MINSA, 2011).

NTC (no template control, control sin templado): Es una muestra con todos los componentes de la reacción, pero sin el ADN (CDC, 2010).

Paroxismos: Son accesos repetitivos de mucha tos rápida, de 5 a 10 golpes seguidos de un fuerte estridor inspiratorio característico (CDC, 2015).

Periodo de incubación: Es el tiempo que transcurre desde la infección hasta que los síntomas se manifiesten (PAHO, 2011).

Primers: Son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN (UNAM, 2004).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es una técnica que consiste en la amplificación controlada de un fragmento de ADN específico de manera sintética (Díaz & Rentería, 2010).

Síndrome Coqueluchoide: Es el término utilizado para contemplar aquellos pacientes que manifiestan un cuadro clínico indistinguible de tosferina, que pueden incluir a virus y bacterias (Cano-Rangel, Durazo-Arvizu, Dorame-Castillo, & Gómez-Rivera, 2012).

Sintomático respiratorio: Es el término empleado para describir signo de tos mayor a 15 días de evolución (PAHO, 2011).

Tosferina: Es una afección respiratoria conocida comúnmente como tos convulsiva o pertussis, enfermedad muy contagiosa causada por un tipo de bacteria llamada *Bordetella pertussis* (CDC, 2015).

CAPÍTULO III

3.1 MARCO METODOLÓGICO

3.1.1 Tipo de estudio

El presente estudio fue de tipo descriptivo retrospectivo. Es descriptivo porque se determinó la frecuencia de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* en muestras nasofaríngeas, mediante el uso de cultivo y pruebas microbiológicas y el uso de pruebas moleculares como PCR convencional y PCR en tiempo real, y retrospectivo porque se realizó en un tiempo único ya transcurrido, en el periodo de agosto 2016 a julio 2017.

3.1.2 Tipo de muestreo

La selección del sujeto de estudio corresponde a muestras nasofaríngeas, que fueron receptadas en el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI dentro del periodo establecido. Para lo cual se empleó un muestreo aleatorio simple.

3.1.3 Tamaño de muestra

Se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo del tamaño muestral con un nivel de confianza del 95% y un error alfa del 5%:

$$n = \frac{N[Z_{1-\alpha}]^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + [Z_{1-\alpha}]^2 * p * q}$$

Donde:

n = Tamaño de la muestra

N = Total de casos sospechosos de tosferina para confirmación en Laboratorio de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI, en el periodo establecido.

$Z^2\alpha = 1,96^2$, dado que el intervalo de confianza es del 95%

p = la proporción esperada según un estudio de investigación es del 12%= 0,12

$q = 1-p$, para este caso $1 - 0,12 = 0,88$

d = se estima cometer un error no superior al 5%= 0,05

Cálculo de la muestra

$$\begin{aligned}n &= \frac{180[1.96]^2 * 0.12 * 0.88}{(0.05)^2 * (180 - 1) + [1.96]^2 * 0.12 * 0.88} \\n &= \frac{180(3.8416) * 0.1056}{0.0025 (179) + (3.8416) * 0.1056} \\n &= \frac{691.48 * 0.1056}{0.4475 + 0.4056} \\n &= \frac{73.020}{0.8531} \\n &= 86\end{aligned}$$

Decisión: se determinó una prevalencia del 12 % según datos preliminares del proyecto de investigación realizado en el INSPI-Quito en el año 2016, resultando 86 muestras clínicamente sospechosas de tosferina, almacenadas en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.

3.1.4 Criterios de inclusión

- Las muestras de hisopado o aspirado nasofaríngeo provenientes de Hospitales de la Sierra del Ecuador, dentro del período de agosto 2016 a julio 2017.
- Muestras nasofaríngeas con fichas epidemiológicas que consten con los datos de edad, sexo, lugar de procedencia hospitalaria, inicio de síntomas y tipo de muestra (ficha Epi-Individual 1).
- Rango de edad 0 a 12 meses.

3.1.5 Criterios de exclusión

- Muestras que no cumplieron con las condiciones de almacenamiento y transporte al Laboratorio de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI.
- Muestra nasofaríngea de una sola fosa nasal (derecha o izquierda).
- Muestras nasofaríngeas que hayan sido tomadas con hisopos de algodón

3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 4*Operacionalización de variables*

Variable Dependiente	Dimensión	Subdimensión	Definición conceptual	Indicadores	Tipo de variable	Niveles de medición	Instrumento de medida
Presencia de <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i> en población pediátrica con sospecha de tosferina	Presencia Ausencia		La tosferina es una afección respiratoria conocida comúnmente como tos convulsiva o pertussis, enfermedad muy contagiosa causada por un tipo de bacteria llamada <i>Bordetella pertussis</i> (CDC, 2015).	Frecuencia relativa (%)	Cualitativa	Nominal	Cultivo y técnicas moleculares
Variable Independiente	Dimensión	Subdimensión	Definición conceptual	Indicadores	Tipo de variable	Niveles de medición	Instrumento de medida
Edad	0-2 meses 3-6 meses 7-11 meses >12 meses		La edad es el periodo en el que transcurre la vida de un ser vivo (OMS, 2016).	Rango	Cuantitativa continua	De razón	Información obtenida de las fichas epidemiológicas (EPI-Individual 1) en años cumplidos.
Sexo	Masculino Femenino		Características sexuales que se atribuye a los seres humanos que distinguen entre hombre y mujer (Academia Española, R, 2014).	Frecuencia relativa (%)	Cualitativo	Nominal	Información obtenida de las fichas epidemiológicas (EPI-Individual 1)
Lugar de residencia hospitalaria	Hospitales de la Sierra que formen parte de la Red Pública Integral de Salud del Ecuador	1. Provincia de Pichincha 2. Provincia de Tungurahua 3. Provincia de Imbabura	Término usado para indicar la casa de salud donde ha sido atendido o reside actualmente un paciente.	Frecuencia relativa (%)	Cualitativo	Nominal	Información obtenida de las fichas epidemiológicas (EPI-Individual 1)

Tipo de muestra	Muestras nasofaríngeas	1. Hisopado 2. Aspirado	Fluido corporal proveniente de varios sitios con el fin de ser estudiado (Siliezar Pineda, 2003).	Frecuencia relativa (%)	Cualitativo	Nominal	Información obtenida de las fichas epidemiológicas (EPI-Individual 1)
Identificación <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i> a partir de muestras nasofaríngeas mediante cultivo y pruebas microbiológicas.	1. Positivo 2. Negativo		El diagnóstico microbiológico directo permite evidenciar el microorganismo o agente etiológico en una muestra determinada (Mühlhauser & Rivas, 2014).	Frecuencia relativa (%)	Cualitativo	Nominal	Cultivo en medio Regan Lowe más cefalexina Tinción gram Pruebas de oxidasa y catalasa Crecimiento de agar MacConkey y urea
Amplificación de los genes de identificación para <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i>	1. Positivo 2. Negativo		La reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).	Frecuencia relativa (%)	Cualitativo	Nominal	Extracción de ADN Amplificación de los genes IS481, ptxA-Pr e IS1001 por PCR punto final Amplificación de los genes IS481 e IS1001 por PCR en tiempo real

Fuente: Elaborado por Saidy Vásconez, 2018

3.3 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.3.1 Cultivo, aislamiento e identificación microbiológica

- Cajas plásticas Bi- Petri; Marca: Gosselin
- Placas portaobjetos
- Guantes de Nitrilo talla S; Marca: Santa Cruz Biotechnology.
- Regan Lowe Agar BD
- MacConkey Agar BD; Marca: Oxoid. Número de Lote: 1727663. FV: 08/2020.
- Agar Urea Base; Marca Oxoid. Número de Lote: 4460382. FV: 10/2018
- Cefadin cápsula de 500 mg (Cefalexina); Marca Life. Número de Lote: 1601112. FV: 05/2019
- Discos de oxidasa; Marca: Sanofi Diagnostics; Número de Lote: 8M246R; FV: 12/2018
- Reactivo de catalasa
- Reactivos para la tinción de Gram (Cristal violeta, Lugol, Alcohol cetona, Safranina)
- Incubadora; Marca: Memmert
- Cámara húmeda

3.3.2 Pruebas moleculares

- Puntas con filtro para pipeta volumen 0.1-10 µL; Marca: Axygen
- Puntas con filtro para pipeta volumen 0.1-10 µL; Marca: Axygen
- Puntas con filtro para pipeta volumen 200 µL; Marca: Axygen
- Puntas con filtro para pipeta volumen 1000 µL; Marca: Axygen
- Microtubos 1.5 mL; Marca: Axygen
- Kit de extracción de ADN- High pure PCR template prep Kit; Marca: Roche
- Kit de amplificación q-PCR - LMX *Bordetella pertussis parapt* TIB; Marca: Roche
- Taq Master Mix 96 reacciones; LC-FastStart DNA MasterHybr; Marca: Roche
- Agua grado molecular; Marca: Promega.
- Solución de PBS, pH: 7,4
- Agarosa 500 gr (Grado analítico); Marca: Promega.
- Ladder 100 pb; Marca: Promega
- SYBR Safe DNA gel stain Invitrogen
- GoTaq Master Mix; Marca: Promega
- TBE 10X
- TAE 40X
- Primers Forward y Reverse para los genes *IS481*, *IS1001* y *ptxA-PR*

- Cabina de bioseguridad; Marca Labconco; N° Serie: 100930645B (Área gris)
- Cabina de bioseguridad; Marca: CSB Scientific; N° Serie: 2072 (Área blanca)
- Microcentrífuga; Marca: Jouan; N° Serie: 39902558
- Termobloque; Marca: Thermomixer; N° Serie: 31409
- Incubadora; Marca: Labnet; N° Serie: 6091109.
- Vórtex; Marca: Genie2; N° Serie: 2-59030
- LightCycler® 480 Instrument II
- Termociclador; Marca: Labnet; N° Serie: 12020020.
- Cámara de electroforesis; Marca: Labnet; N° Serie: 120731026.
- Transiluminador; Marca: BioRad; N° Serie: 721BR12258.
- Software UVP

3.4 FASES METODOLÓGICAS

3.4.1 Fase I. Aprobaciones

En primer lugar, se obtuvo las cartas de autorización para la presentación del protocolo de investigación, el mismo que fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE, considerándose científicamente aceptable, ver Anexo 1. El presente estudio se limitó a un análisis retrospectivo de datos provenientes del Sistema de Vigilancia Epidemiológica para dicha enfermedad, cuyos datos se mantuvieron encriptados de manera tal que se garantizó la privacidad y confidencialidad de los mismos.

3.4.2 Fase II. Recolección de datos epidemiológicos y selección de muestras

Se evaluó las fichas epidemiológicas con la finalidad de constatar la información relevante para la obtención de datos sociodemográficos y clínicos de cada muestra. Se elaboró una base de datos donde se registró la edad, género, lugar de procedencia, tipo de muestra, inicio de síntomas, diagnóstico inicial determinado por el médico en base a los criterios clínicos. Para la selección de las muestras se empleó un muestreo simple aleatorio de acuerdo a los criterios de inclusión.

3.4.3 Fase III. Análisis microbiológico e identificación

Las muestras nasofaríngeas se procesaron de la siguiente manera: primero se realizó la siembra por agotamiento en medio de cultivo Regan Lowe suplementado con cefalexina, para luego suspender el hisopo dentro de un microtubo con 500 µL de PBS para el procesamiento molecular.

Después de la siembra en el medio de cultivo se incubó a 37°C y debido al requerimiento de humedad para su desarrollo se colocó las cajas dentro de una cámara húmeda, entre 7 a 10 días. Una vez que se evidenció crecimiento, se evaluaron las colonias presuntivas para la identificación de *Bordetella spp*; a partir de dichas colonias se realizó la identificación y diferenciación de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* mediante las siguientes pruebas microbiológicas y bioquímicas: coloración Gram, oxidasa, catalasa, ureasa en tubo y desarrollo en Agar MacConkey, ver Anexo 2. Las cepas confirmadas como *Bordetella spp* fueron almacenadas en BHI más glicerol al 20% a -70°C.

3.4.4 Fase IV. Análisis molecular

El análisis molecular consistió en la extracción de ADN y amplificación de los genes de identificación, ensayos que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y el Laboratorio de Influenza del INSPI-CZ9. A continuación, se detalla cada una de las fases con los correspondientes protocolos empleados:

3.4.4.1 Extracción de ADN a partir de la suspensión del HNF

La extracción de ADN a partir de la suspensión se llevó a cabo mediante el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche. El microtubo de 1,5 mL el cual contenía la suspensión de la muestra nasofaríngea de la fosa derecha e izquierda, en solución de PBS se homogenizó por vortex aproximadamente 1 minuto, posterior a esto se centrifugó a 13,500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó hasta obtener un volumen superior a los 200 µL. Se homogenizó nuevamente por vortex y luego se trasvasó 200 µL de la muestra en un tubo de 1,5 mL estéril, el mismo que fue el punto de partida para el protocolo de extracción de ácidos nucleicos a partir de bacterias, ver Anexo 3. Finalmente, el ADN extraído fue cuantificado, mediante espectrofotometría usando el equipo *Nanodrop Thermo Fisher Scientific®* y a través de corridas electroforéticas a 90 voltios por 20 minutos en geles de agarosa al 1,5%, para asegurar que la concentración y la calidad del ADN fueran las óptimas. Posteriormente, el ADN fue almacenado a -20°C.

3.4.4.2 Amplificación de los genes de identificación

- Identificación por PCR convencional

A través de la técnica de PCR convencional se realizó la identificación de las especies de *Bordetella*, para lo cual se utilizó primers específicos *IS481* y *ptxA-PR* para *Bordetella pertussis* e *IS1001* para *Bordetella parapertussis*, detallados en la Tabla 5.

Tabla 5

Secuencias de primers utilizadas para la identificación de las especies de Bordetella pertussis y Bordetella parapertussis

PRIMER	SECUENCIA	PB
IS 481	F 5' –GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT- 3'	182 pb
	R 5' -TTCAGGCACACAAACTTGATGGGCG- 3'	
ptxA – PR	F 5' – CGCCAAGCTGAAGTAGCA- 3'	537 pb
	R 5' – AAGGAGCGTTCATGCCG- 3'	
IS 1001	F 5' – CACCGCCTACGAGTTGGAGAT- 3'	172 pb
	R 5' – CCTCGACAATGCTGGTGTTC- 3'	

Nota: F= Forward, R= Reverse. Adaptado de “European Centre for Disease Prevention and Control (2012). Guidance and protocol for the use of realtime PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *parapertussis*,” por Saidy Vásconez, 2018.

La preparación de la Master Mix se especifica en la Tabla 6; además, el programa de termociclado para la amplificación de estos genes se detalla en la Tabla 7. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2% tenido con SYBR Safe-DNA Gel Stain, mediante una corrida electroforética a 90 voltios por 40 minutos con buffer TAE 1X para su posterior visualización en el fotodocumentador, gel documentation system de BioRad.

Tabla 6

Preparación de Master Mix para los genes IS481, ptxA-PR y IS1001

Reactivo	Genes Identificación de especies			Concentración
	IS 481 Cantidad	ptxA- PR Cantidad	IS 1001 Cantidad	
Agua molecular	4,75 µL	4,05 µL	4,25 µL	-
Primer Forward	0,25 µL	0,7 µL	0,5 µL	10 µM
Primer Reverse	0,25 µL	0,5 µL	0,5 µL	10 µM
Taq Master Mix	6,25 µL	6,25 µL	6,25 µL	1x
ADN	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	
Volumen final		12,5 µL		

Fuente: Elaborado por Saidy Vásconez, 2018

Tabla 7

Programa de termociclado para la amplificación de las secuencias IS481, ptxA-PR y IS1001

Fase	Gen		
	<i>IS 481</i>	<i>ptxA- PR</i>	<i>IS 1001</i>
Denaturación (5min)	94 °C	94 °C	94 °C
Hibridación (30s)	63,6 °C	55,0 °C	60,4 °C
Extensión (30s)	72 °C	72 °C	72 °C
Ciclos	25 ciclos	25 ciclos	25 ciclos
Extensión final (10min)	72 °C	72 °C	72 °C

Fuente: Elaborado por Saidy Vásconez, 2018

- **Identificación por PCR en tiempo real**

Para la identificación de las especies de *Bordetella* se realizó una amplificación de las regiones *IS481* e *IS1001* específicas para *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, respectivamente. En la reacción de q-PCR, se incluyen tres controles: i) un control positivo para dichos genes de identificación (*B. pertussis* y *B. parapertussis*), ii) un control negativo que fue agua de grado molecular y iii) un control interno para *Bordetella pertussis*.

Uno de los requerimientos previos para la programación del ensayo es la compensación de color mediante el kit LightMix Color Compensation HybProbe 530/640/690, que permite realizar experimentos de doble color con las sondas HybProbe, el mismo que fue desarrollado por el equipo técnico de Roche. Posterior a lo mencionado, se realizó un ensayo de amplificación para la obtención de curvas estándares de ambos microorganismos.

Los estándares fueron reconstituidos con 40 µL de agua de grado molecular para conseguir 6 concentraciones diferentes que iban desde 10^1 a 10^6 copias de ADN bacteriano y luego emplear 5 µL de cada estándar en la reacción de q-PCR para la obtención del rango lineal de reacción. De la misma manera, los controles de ADN fueron reconstituidos para alcanzar una concentración final de 10^5 copias de ADN en un volumen de 5 µL.

La preparación de la Master Mix para la reacción de q-PCR fue realizada acorde a las cantidades y concentraciones detalladas en la Tabla 8.

Tabla 8

Preparación de Master Mix para la identificación de secuencias especie-específicas de Bordetella pertussis y Bordetella parapertussis

Reactivos	Volumen μL (1)x	Concentración
H ₂ O grado molecular	6.6	-
Mg ²⁺	2.4	25mM
Primers y sondas	2.0	Primers: 0.5 μM Sondas: 0.2 μM
IC	2.0	
Master Mix (TaqMan)	2.0	10x
ADN	5.0	
Volumen final		20 μL

Fuente: Elaborado por Saidy Vásquez, 2018

Las condiciones para la PCR en tiempo real consistieron en la programación de 4 pasos: desnaturalización, amplificación, curvas melting y enfriamiento, además de la selección de combinación de filtros 465-510, 498-640, 498-660 en el LighCycler 480 II. Los pasos del programa se explican en la Tabla 9.

Tabla 9

Programa de termociclado para la amplificación de las secuencias de identificación por PCR en tiempo real

Programa	Pasos	Modo de análisis	Ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Modo de adquisición
Denaturation	Desnaturalización inicial	-	1	95	10 min	-
Cycling	Desnaturalización	Cuantificación	50	95	05 seg	-
	Apareamiento			62	05 seg	Único
	Extensión			72	15 seg	-
Melting	Desnaturalización	Curvas Melting	1	95	30 seg	-
	Apareamiento			40	01 min	-
	Extensión			80	-	Continuo
Cooling	Extensión final	-	1	40	30 seg	-

Fuente: Adaptado de “Manual de LightMix Kit *Bordetella pertussis* and *parapertussis*, (2017)- Roche Applied. TibMolbiol,” por Saidy Vásquez, 2018

3.5 CONTROL DE CALIDAD

3.5.1 Control de calidad del medio de cultivo Regan Lowe

Se efectuó el control de calidad de los medios de cultivo utilizados en el presente estudio, a través de la evaluación de las características físicas y el control de desempeño del medio con el cultivo de cepas ATCC, según establezca el fabricante.

Para evaluar la esterilidad de los medios de Regan Lowe, primero evaluó la sangre de caballo utilizada en su preparación. Por otro lado, dichos medios fueron incubados a 37°C por 24 horas. Adicionalmente, con la finalidad de evaluar la selectividad del medio de Regan Lowe se sembró una cepa de *Bordetella pertussis* ATCC 9797, para poder diferenciar a los aislados de *Bordetella* spp. de otras especies que presenten un crecimiento con las mismas características fenotípicas.

3.5.2 Control de calidad de las pruebas microbiológicas de detección de *Bordetella* spp.

Por otro lado, se evaluó la calidad de las pruebas microbiológicas empleadas en la detección de *Bordetella* spp. a través del uso de una cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 como control positivo para el crecimiento en el medio de agar MacConkey, proporcionada por el Centro Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI.

3.5.3 Control de calidad de las técnicas de PCR

Para la evaluación de los diversos genes de amplificación mediante q-PCR, se utilizó DNA bacteriano que contenía los genes *IS481* e *IS1001* incluidos en el Kit de Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe de Roche. Por otro lado, se realizó las curvas de estandarización para *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* como uno de los parámetros necesarios para poder cuantificar el número de copias de cada muestra. Para el control de calidad de la PCR convencional se empleó la extracción de ADN de la cepa ATCC 9797 para *Bordetella pertussis*, la misma que amplificó para los genes *IS481* y *ptxA-PR*; mientras tanto, para la evaluación del gen *IS1001* se empleó un control positivo de *Bordetella parapertussis* proporcionado por el INSPI.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

La información clínica de los pacientes, los resultados obtenidos por el cultivo microbiológico y por la amplificación de los genes por PCR en tiempo real se organizó en una base de datos, para su posterior tabulación y análisis estadístico mediante análisis porcentuales de frecuencias para lograr una distribución de las variables del estudio, que se representaron en tablas y gráficos de frecuencia. Se empleó el estadístico ji-cuadrado, con el objetivo de contrastar las frecuencias observadas con las frecuencias esperadas de acuerdo con los objetivos planteados. Para valorar la utilidad diagnóstica, se analizaron los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, mediante una tabla de 2x2, confrontando los resultados de las pruebas de cultivo y PCR convencional.

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Datos epidemiológicos de la población en estudio

A partir de agosto 2016 a julio 2017 se recibieron muestras de 180 casos sospechosos de tosferina con formulario EPI 1 para su confirmación mediante cultivo. Del total de muestras receptadas se trabajó con un n=86, las cuales provenían de distintas instituciones de salud de la región Sierra del país; el mayor porcentaje de casos sospechosos de tosferina fueron notificados por la unidad de salud H002, que representa el 35%, seguido de un 13% del H005 y 12% del H009, como se observa en la Figura 4.

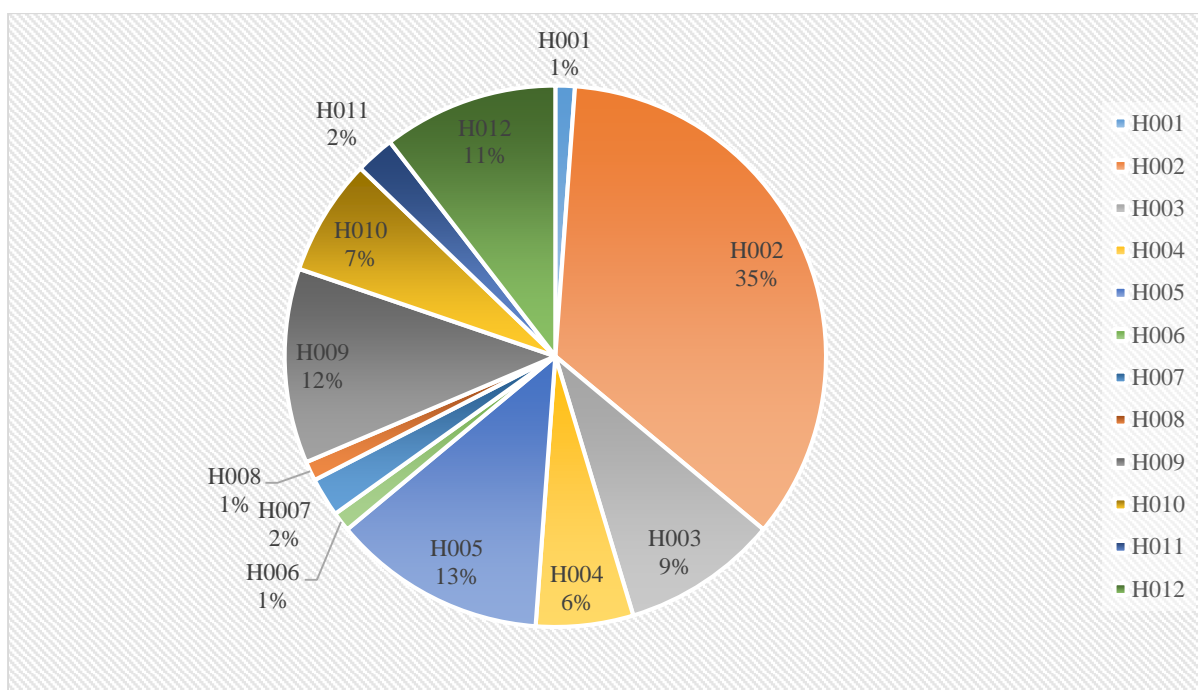


Figura 4. Frecuencia de casos sospechosos de tosferina con respecto a la institución de salud que notifica.

Fuente: Investigación *Elaborado por:* Saidy Vásconez

El 45% de los pacientes corresponde al sexo femenino; mientras que el 55% fueron de sexo masculino. En edades comprendidas entre 0 a 12 meses, el rango de edad más frecuente de casos sospechosos de tosferina es de 0 a 3 meses con el 65%, como se observa en la Figura 5.

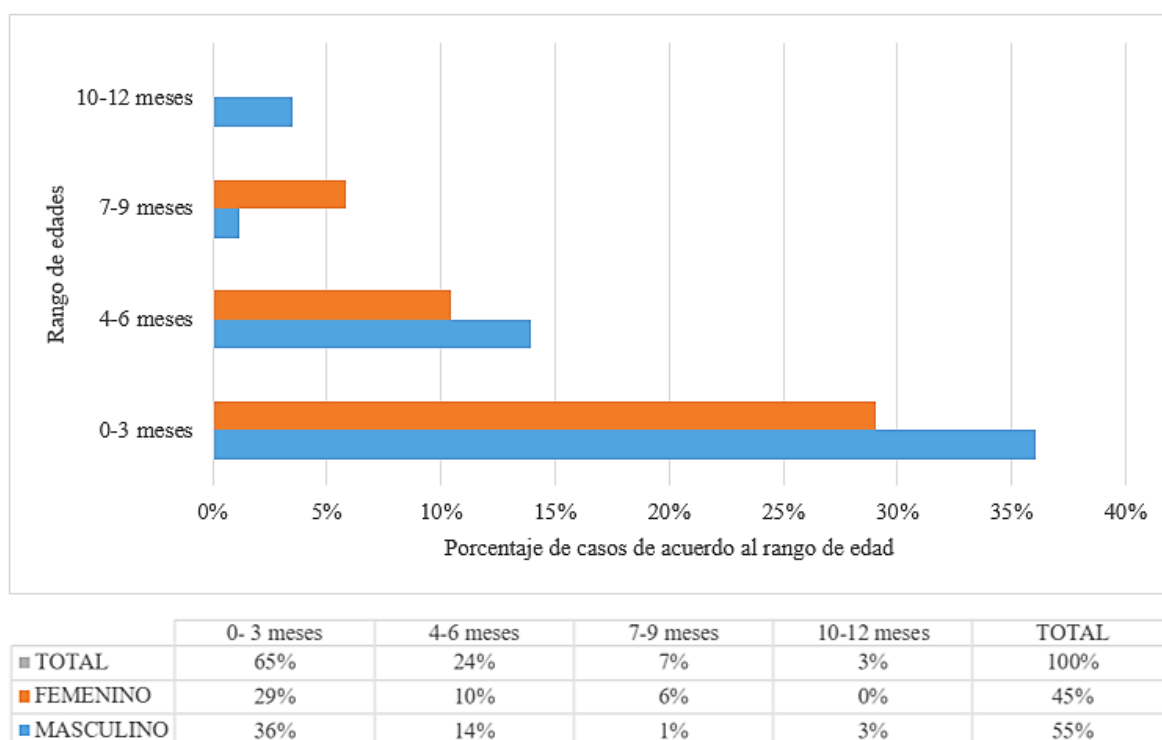


Figura 5. Representación del porcentaje de pacientes de acuerdo al rango de edades en relación con el sexo.

Fuente: Investigación *Elaborado por:* Saidy Vásconez

En cuanto al tipo de muestra, el 95% fueron hisopados nasofaríngeos transportados en medio semisólido de Regan Lowe con hisopos de punta de alginato de calcio; mientras que sólo el 5% fueron muestras de aspirado nasofaríngeo, enviadas en frasco estéril de tapa hermética.

4.1.2 Identificación microbiológica

La identificación de los microorganismos se evidenció mediante las pruebas macroscópicas, microscópicas y microbiológicas. En el estudio macroscópico, tras la siembra en medio de cultivo Regan Lowe más cefalexina se las consiguió identificar como colonias convexas, redondas bien definidas, brillosas, similares a una gota de agua; mientras que por análisis microscópico se visualizaron coco bacilos Gram negativos, como se observa en la Figura 6. En la identificación microbiológica que permite diferenciar entre especies de *Bordetella* se obtuvieron los siguientes resultados: oxidasa positiva, catalasa positiva, urea negativa y crecimiento en Agar MacConkey negativo, ver Anexo 2. De las 86 muestras incluidas en el estudio, el 23% resultaron positivas; mientras que el 77% fueron negativas para *Bordetella* spp. Se obtuvo que el 100% de las muestras positivas corresponden a *Bordetella pertussis*.

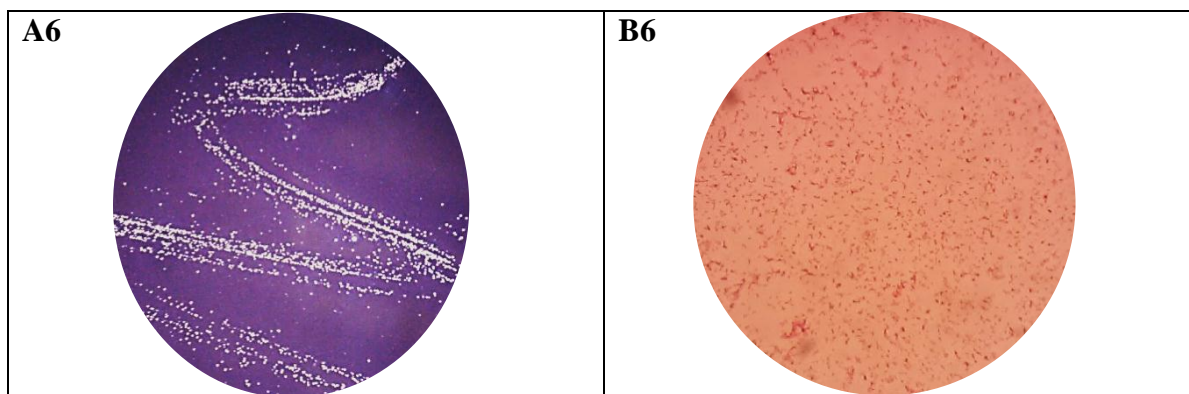


Figura 6. Estructura morfológica de *Bordetella* spp. La figura A6 corresponde a la morfología macroscópica de *Bordetella* spp. y la figura B6 a la morfología microscópica de *Bordetella* spp.

Fuente: Investigación **Elaborado por:** Saidy Vásconez

A continuación, se muestra la relación entre el sexo y los resultados obtenidos mediante cultivo microbiológico, indicando un 10% de resultados positivos para *Bordetella pertussis* correspondiente al sexo femenino y un 13% al sexo masculino; mientras que en los resultados negativos se presentó un mayor porcentaje en el sexo masculino, como se observa en la Figura 7.

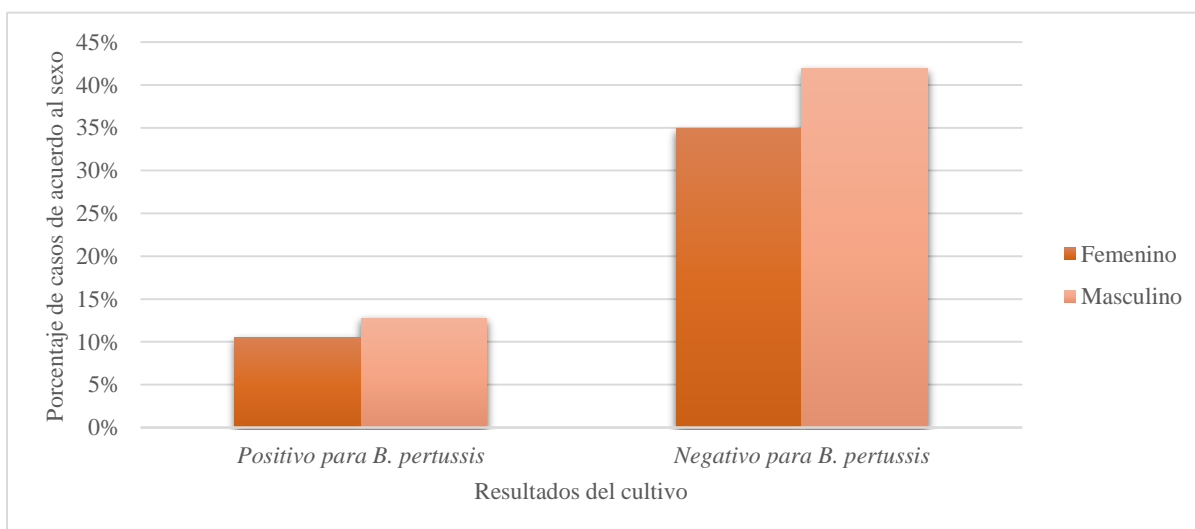


Figura 7. Representación del porcentaje de casos de acuerdo al sexo en relación con los resultados de cultivo microbiológico.

Fuente: Investigación **Elaborado por:** Saidy Vásconez

De la misma forma, se realizó la relación de la edad con los resultados del cultivo, el porcentaje de casos que presentó mayor frecuencia fue el rango de edad de 0 a 3 meses, cuyos resultados por cultivo fueron negativos en su mayoría, tal como se observa en la Figura 8.

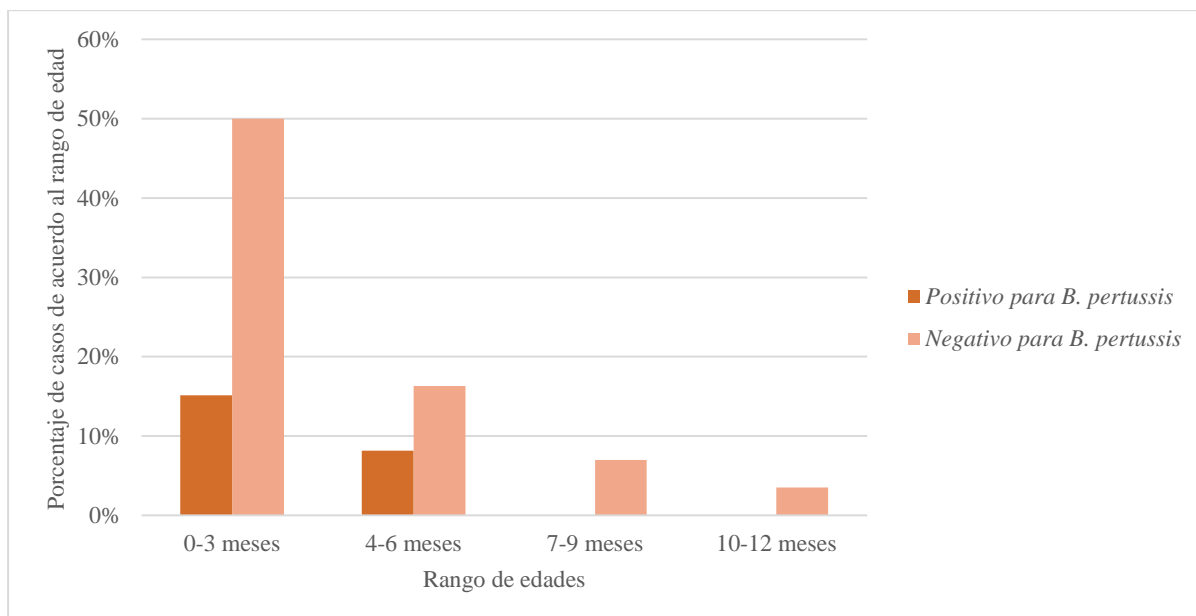


Figura 8. Representación del porcentaje de casos de acuerdo al rango de edad en relación con los resultados de cultivo microbiológico.

Fuente: Investigación **Elaborado por:** Saidy Vásconez

4.1.3 Identificación genotípica de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*

A través de la técnica molecular de PCR punto final se realizó la amplificación de los genes *IS481*, *ptxA-PR* y *IS1001*, de los cuales, el 41% resultaron positivos para *IS481* y *ptxA-PR* específicos de *Bordetella pertussis*, mientras que el 59% restante fueron negativas para todos los genes, ver Figura 9. También, se obtuvo una muestra que amplificó para los genes *IS481* e *IS1001*, como se observa en la Figura 10.

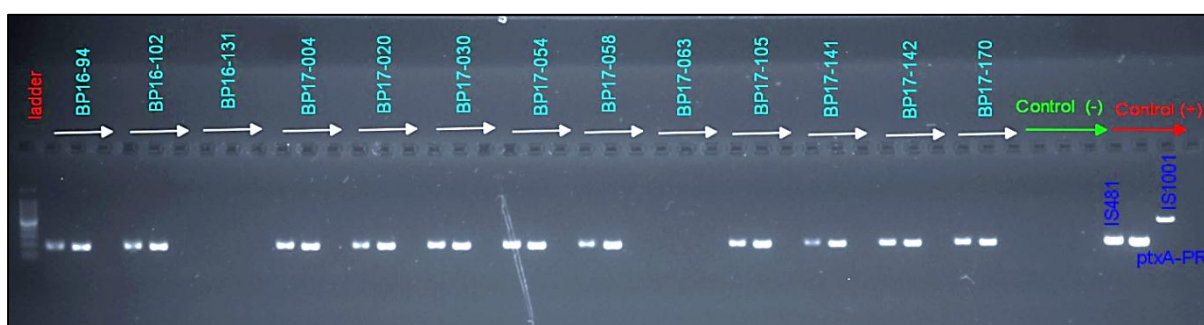


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 2% de la amplificación de los genes *IS481*, *ptxA-PR* e *IS1001*.

Fuente: Investigación

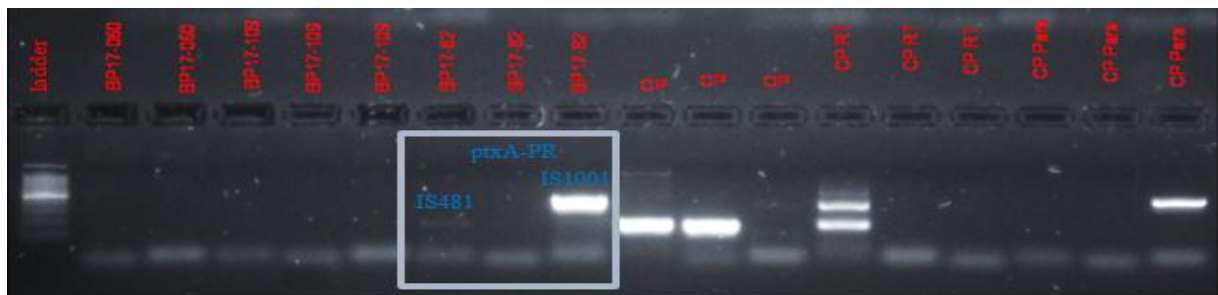


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 2% de la amplificación de los genes IS481 e IS1001 en un espécimen del estudio (BP17- 082).

Fuente: Investigación

4.1.4 Identificación genotípica de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* mediante PCR en tiempo real

4.1.4.1 Amplificación de las curvas estándares para *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*

Como se menciona en la fase metodológica, se realizó la amplificación de las curvas de calibración a partir de 6 estándares de ambos microorganismos desde 10^1 a 10^6 copias de ADN. En las curvas estándares para *Bordetella pertussis* se obtuvo una eficiencia de 1,949 y un error de 0,024; mientras que *Bordetella parapertussis* presentó una eficiencia de 2,00 y un error de 0,006. En la amplificación de las curvas para *Bordetella pertussis* se obtuvo un valor de CP= 16,21 correspondiente al estándar 6 hasta un CP=32,80 del estándar 1, como se observa en la Figura 11. En cuanto a las curvas para *Bordetella parapertussis*, se tuvo un valor de CP=17,84 del estándar 6 a un CP=33,67 correspondiente al estándar 1, como se observa en la Figura 12.

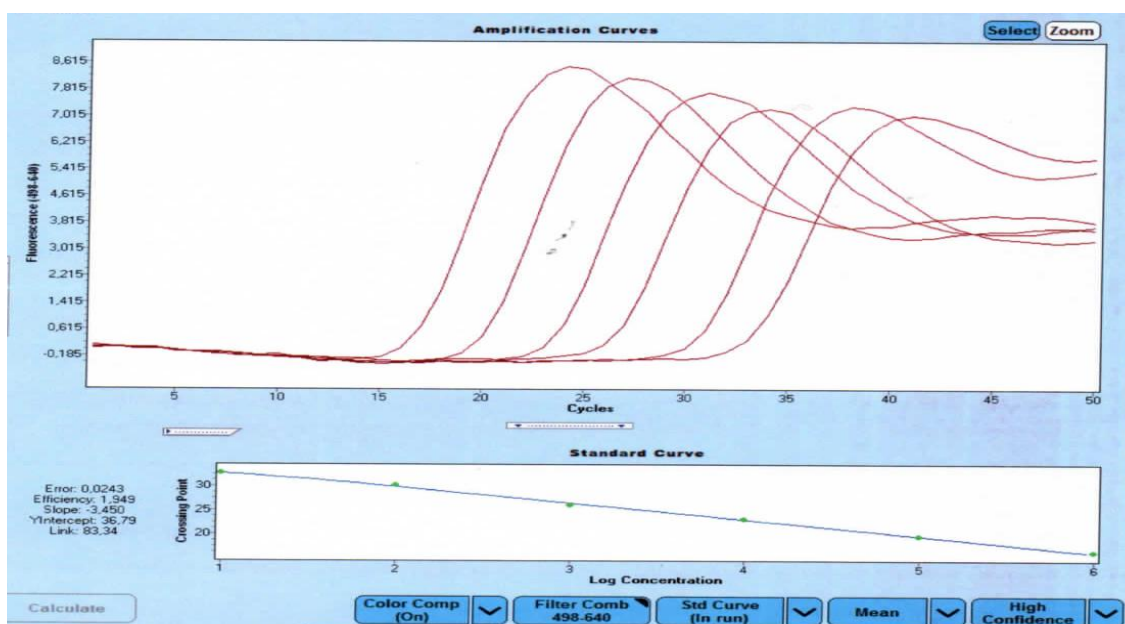


Figura 11. Amplificación de las curvas estándares para *Bordetella pertussis*, filtro 498-640.

Fuente: Investigación

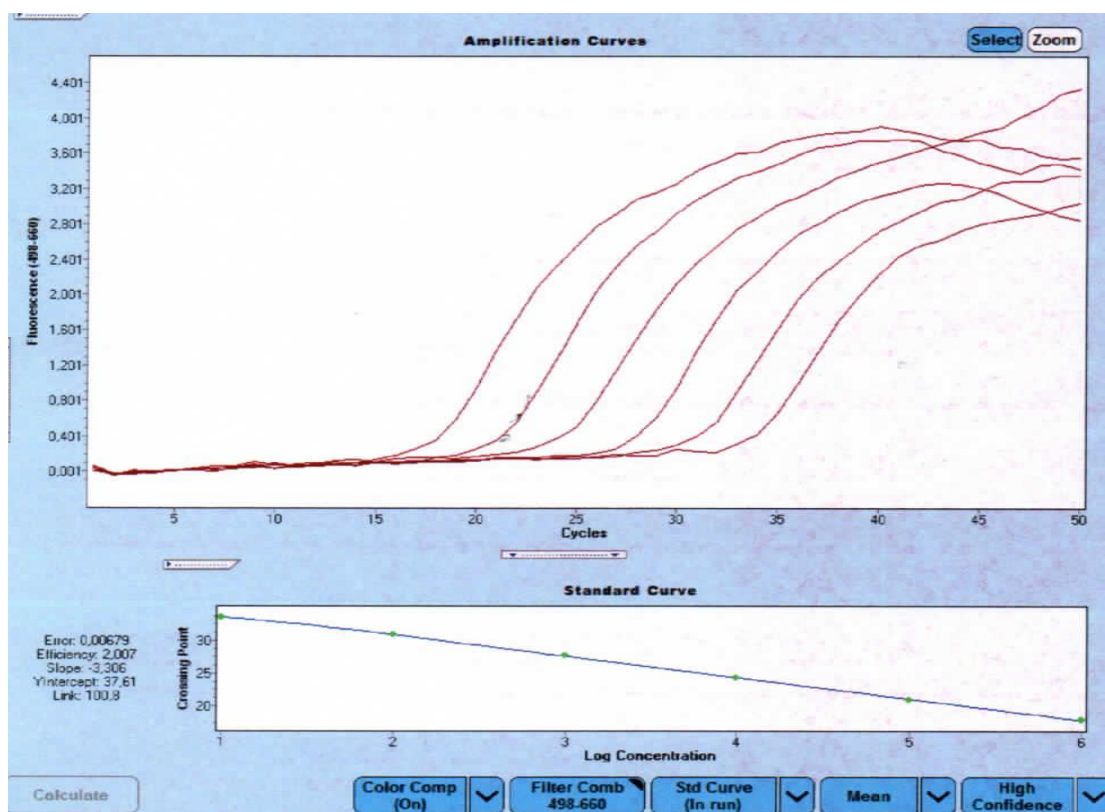


Figura 12. Amplificación de las curvas estándares para *Bordetella parapertussis*, filtro 498-660.
Fuente: Investigación

4.1.4.2 Amplificación de los ADN extraídos de las muestras nasofaríngeas para la detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*

Según el protocolo establecido por el kit comercial LightMix® Kit *Bordetella pertussis* and *parapertussis*, ver Anexo 4. Se amplificaron los genes *IS481* e *IS1001* con los canales de detección 498-640 y 498-660, para la identificación de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, respectivamente. Para la interpretación de los resultados se tomaron en cuenta las curvas de amplificación y las curvas de melting. Los controles positivos presentaron señales de amplificación, mientras que los controles negativos permanecieron negativos (sin señal). Para confirmar los controles y muestras negativas se verificó la acción del control interno en el filtro 498-640 a través de la curva de melting con un pico en 49,5°C, como se observa en la Figura 13.

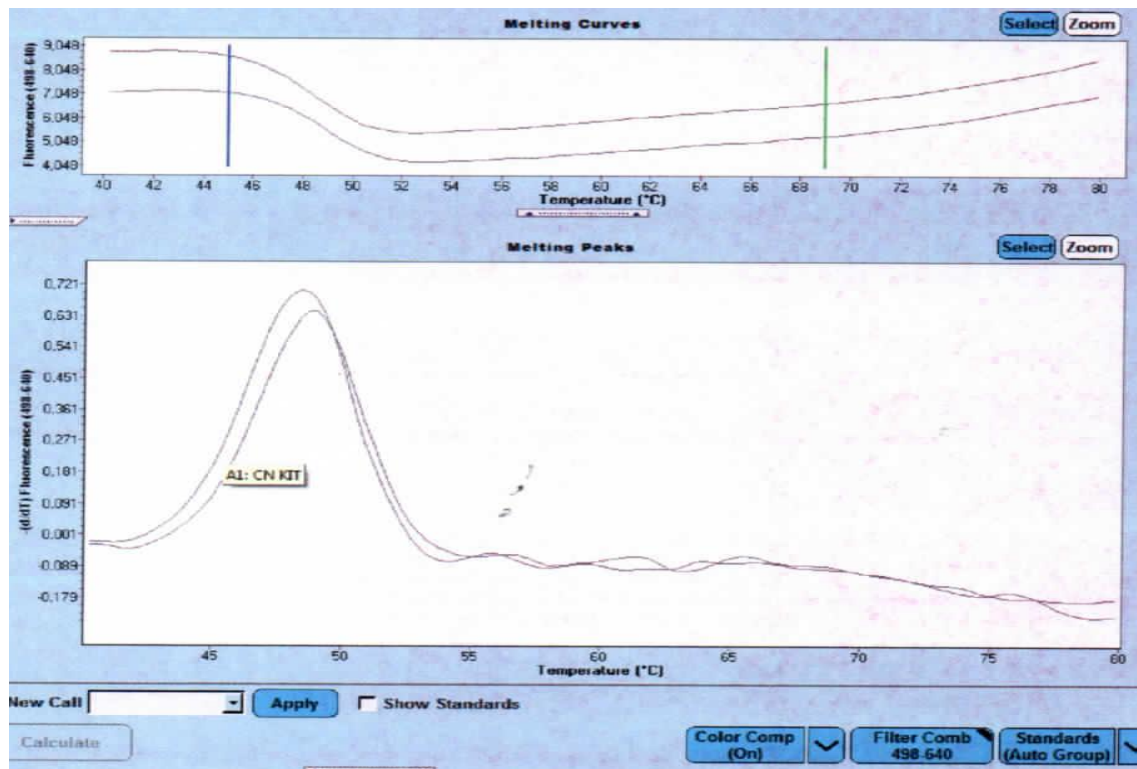


Figura 13. Amplificación del melting peaks para las muestras o controles negativos, en el canal de detección 498-640.

Fuente: Investigación

Los posibles resultados se establecieron conforme a los criterios del inserto y del operador. Se consideró una muestra negativa para *Bordetella*, cuando no presentara señal de amplificación en ninguno de los canales de detección, pero elevación del pico en melting. Las muestras probablemente positivas para *Bordetella pertussis*, fueron aquellas que presentaron elevación en el canal 498-640, controles positivos con un Ct entre 20-23 y control negativo sin señal; mientras que una muestra positiva para *Bordetella parapertussis* amplifica en el filtro 498-660, controles positivos con un valor de Ct entre 20-23 y controles negativos sin señal, como se observa en la Figura 14 y Figura 15. Además, puede existir casos de co-infección o posible *Bordetella bronchiseptica*, según lo explica la guía de la ECDC, cuando exista amplificación de ambos genes, con señal en los dos canales de detección; lo cual se presentó en una muestra del estudio, como se observa en la Figura 16.

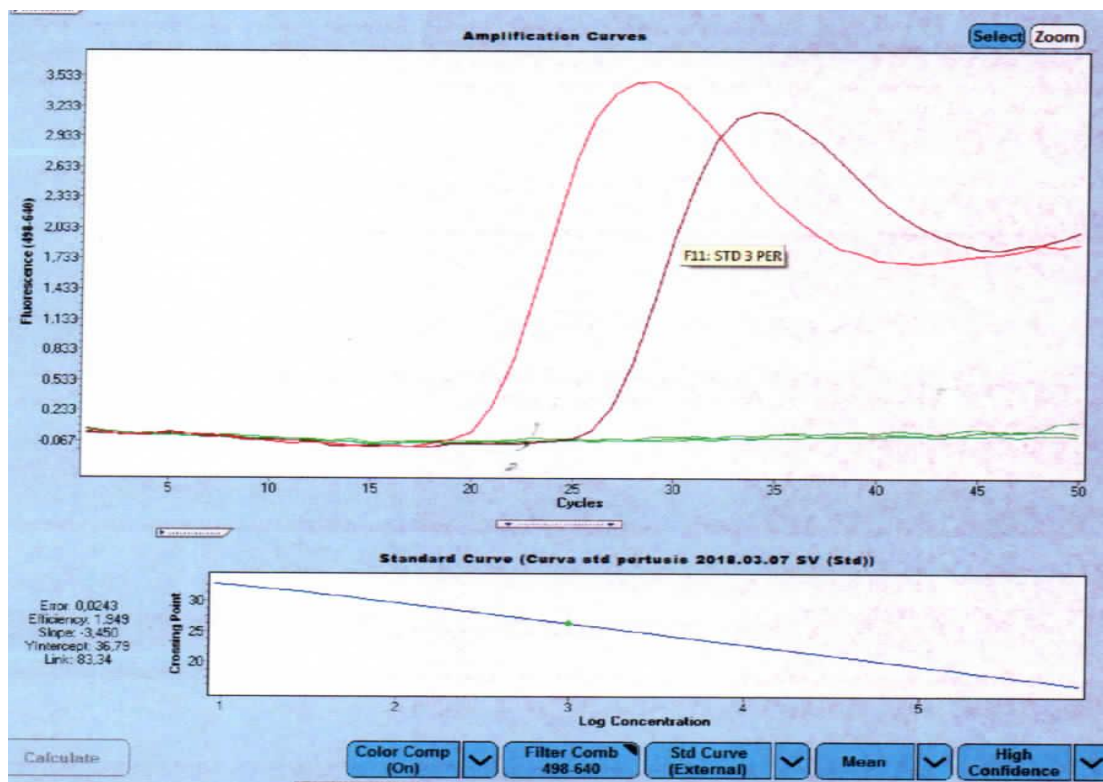


Figura 14. Amplificación del control positivo, negativo y estándar 3 para *Bordetella pertussis*, filtro 498-640.

Fuente: Investigación

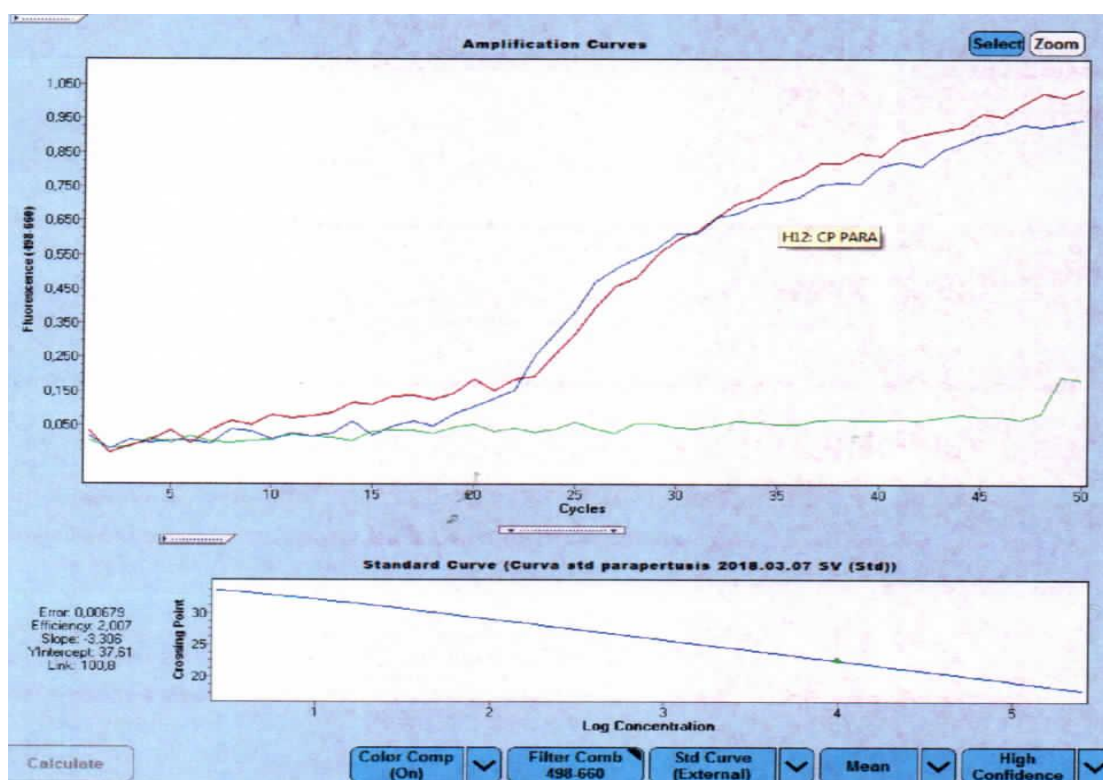


Figura 15. Amplificación del control positivo, negativo y estándar 4 para *Bordetella parapertussis*, filtro 498-660.

Fuente: Investigación

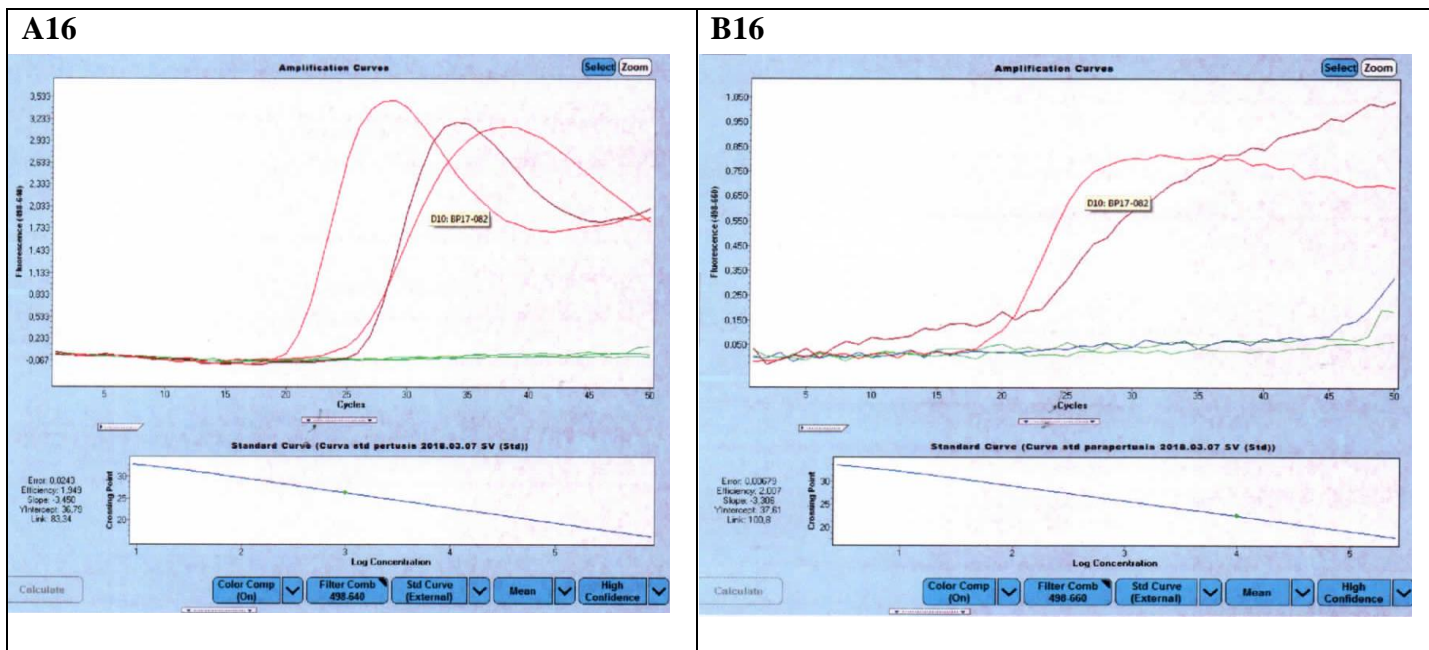


Figura 16. Amplificación de la muestra BP17-082 por PCR en tiempo real. La figura A16 muestra la amplificación en el canal de detección 498-640 y la figura B16 en el canal de detección 498-660.

Fuente: Investigación

Se amplificaron ambos genes para los 86 ADN's del estudio, ver Anexo 7, de los cuales 85 resultaron positivos para *Bordetella pertussis* y un sólo caso de co-infección entre ambos genes. Los experimentos fueron validados a través de los controles negativos tanto de la extracción del ADN, blancos (agua de grado molecular), hisopados de pacientes sanos, muestras no relacionadas como ARN y *Streptococcus pneumoniae*, los controles positivos y estándares, como se observa en la Figura 17. Sin embargo, al analizar los experimentos y debido a la elevada carga (Ct) de ADN que presentaron ciertas muestras posiblemente ocasionaron falsos positivos, por generación de aerosoles. Esto dificultó analizar la relación entre el cultivo microbiológico y la PCR en tiempo real, para lo cual se decidió comparar con los resultados de la PCR convencional.

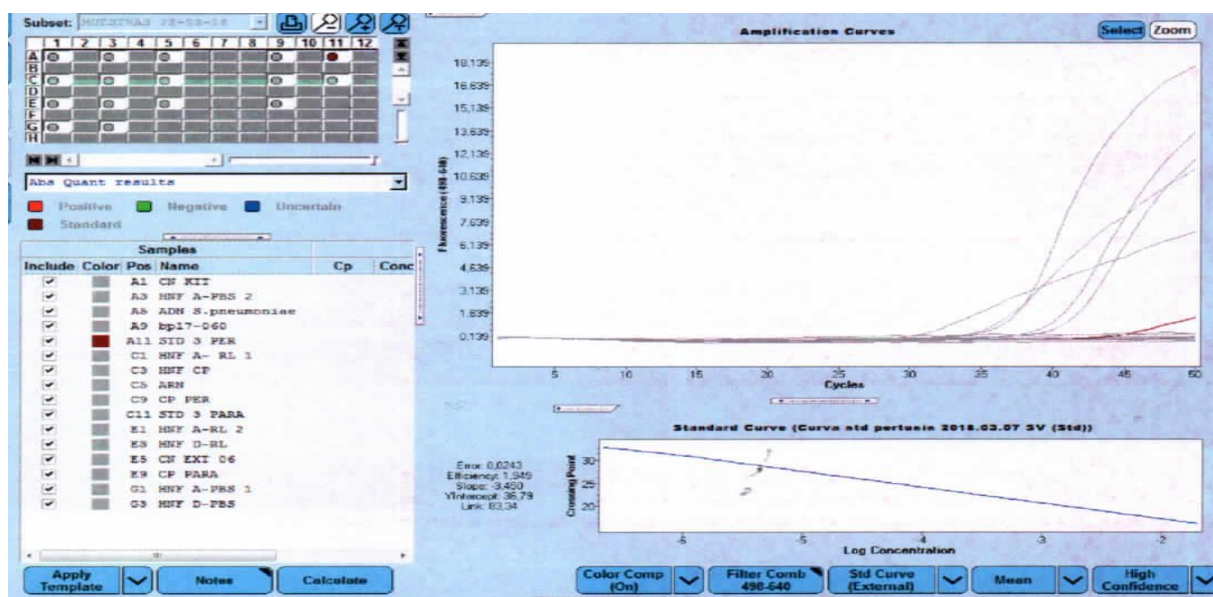


Figura 17. Amplificación de las muestras controles de pacientes sanos y enfermos, muestras no relacionadas, en el canal de detección 498-640.

Fuente: Investigación

4.1.5 Relación entre la detección de *Bordetella pertussis* por PCR convencional con la identificación mediante cultivo microbiológico

En términos de sensibilidad y especificidad se relacionó los resultados obtenidos a través de ambas técnicas de diagnóstico, siendo la PCR convencional el método de comparación con respecto al cultivo microbiológico, método Gold estándar. Se obtuvo un valor de sensibilidad del 78,9% y especificidad del 71,2%, valor predictivo positivo del 44,1% y valor predictivo negativo de 92,1%, como se expresa en la Tabla 10.

Tabla 10

Sensibilidad y especificidad de la PCR convencional frente al cultivo en la detección de Bordetella spp.

		CULTIVO		
		Positivo para <i>B. pertussis</i>	Negativo para <i>B. pertussis</i>	Total
PCR Convencional	Positivo para <i>B. pertussis</i>	15	19	34
	Negativo para <i>B. pertussis</i>	4	47	51
	Total	19	66	85

Sensibilidad: 78,9%; Especificidad: 71,2%; VPP: 44,1%; VPN: 92,1%

Fuente: Investigación *Elaborado por:* Saidy Vásquez

4.1.6 Relación entre el periodo de inicio de síntomas y el diagnóstico mediante cultivo y PCR

De las fichas epidemiológicas de la notificación de caso se ocuparon datos de inicio de síntomas de cada paciente y su respectiva fecha de procesamiento en el laboratorio; es así como se calculó el tiempo transcurrido entre el inicio del cuadro clínico y su análisis respectivo para evaluar una posible relación entre el número de días transcurridos de la enfermedad con el tipo de metodología para la detección de estos microorganismos. La fase de la enfermedad se relacionó con el diagnóstico mediante cultivo realizando una prueba de chi cuadrado considerando una diferencia significativa con un valor de $p < 0,05$. Se determinó que existe relación estadísticamente significativa entre la detección mediante cultivo microbiológico a partir del día 1 al día 12 del inicio de síntomas, como se observa en la Tabla 11.

Tabla 11

Relación del periodo de inicio de síntomas con el diagnóstico mediante cultivo

PERÍODO DE INICIO DE SÍNTOMAS	CULTIVO		
	<i>Positivo para B. pertussis</i>	<i>Negativo para B. pertussis</i>	<i>Total</i>
1-4 días	2,3%	8,1%	10,5%
5-8 días	4,7%	32,6%	37,2%
9-12 días	11,6%	12,8%	24,4%
13-17 días	2,3%	14,0%	16,3%
18-22 días	2,3%	9,3%	11,6%
Total	23,3%	76,7%	100%
Chi cuadrado de Pearson	Valor: 9,457; gl: 4; p-valor: 0,04		

Fuente: Investigación **Elaborado por:** Saidy Vásquez

Por otro lado, el análisis realizado entre el tiempo transcurrido del inicio de los síntomas y la detección mediante PCR convencional no mostró relación de dependencia; es decir, al realizar la prueba de chi cuadrado se obtuvo un valor de $p > 0,05$. Se determinó que no existe relación estadísticamente significativa entre la detección mediante PCR convencional y el periodo de manifestación de los síntomas desde el día 1 al día 22, como se muestra en la Tabla 12. En general, el 23,3% (20/86) de las muestras de HNF positivas para cultivo y el 41% (35/86) de las muestras de HNF positivas para PCR convencional fueron colectadas en ≤ 22 días después de la aparición de la tos.

Tabla 12*Relación del periodo de inicio de síntomas con el diagnóstico mediante PCR convencional*

PERÍODO DE INICIO DE SÍNTOMAS	PCR convencional		
	<i>Positivo para B. pertussis</i>	<i>Negativo para B. pertussis</i>	<i>Total</i>
1-4 días	2,3%	7,0%	9,3%
5-8 días	11,6%	24,4%	36,0%
9-12 días	13,6%	10,5%	24,1%
13-17 días	7,0%	10,5%	17,4%
18-22 días	5,8%	7,0%	12,8%
Total	40,7%	59,3%	100%
Chi cuadrado de Pearson	Valor: 1,283; gl: 4; p-valor: 0,86		

Fuente: Investigación *Elaborado por:* Saidy Vásquez

4.1.7 Establecimiento de un algoritmo diagnóstico de laboratorio para la detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*.

Dado la oportunidad de mejora que promueve el laboratorio de referencia para la confirmación y detección de *Bordetella pertussis* en casos de sospecha de tosferina busca implementar nuevas metodologías diagnósticas que permitan complementar al cultivo microbiológico, sin la necesidad de recurrir a cepas viables; es así como, a través del análisis de los resultados obtenidos en este estudio se ha planteado una guía práctica para el manejo de las muestras desde su transporte, conservación y procesamiento en el laboratorio, con la finalidad de mejorar la eficacia del diagnóstico en términos de sensibilidad y a la vez proporcionar resultados rápidos para asegurar un tratamiento oportuno. Además, de reforzar los protocolos establecidos en la identificación de dichos microorganismos por parte del sistema integrado de vigilancia epidemiológica de la enfermedad. En la Figura 18, se puede observar la propuesta de un algoritmo diagnóstico de laboratorio en la confirmación de los casos con sospecha de tosferina.

En el mercado se encuentra disponible una amplia gama de kits para la detección de patógenos respiratorios como *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*; entre los cuales se halla el panel respiratorio Multi Well System (MWS r-gene®) de uso diagnóstico in vitro que permite la detección de dichos patógenos de forma simultánea por PCR en tiempo real (bioMérieux).

También se comercializa las pruebas moleculares de Simplex[™] *Bordetella* Universal Direct PCR en tiempo real que pueden ayudar en la detección diferencial rápida y el diagnóstico de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* (FocusDiagnostics, 2012). Por otro lado, el

panel respiratorio de FilmArray cuenta con un ensayo que permite la identificación de *Bordetella pertussis* a través de la secuencia *IS481* (BioFireDiagnostics, LLC). No obstante, estos métodos moleculares disponibles se basan en una única secuencia para la distinción de especie; mientras que, el CDC utiliza y recomienda una PCR multiplex en tiempo real que permite la confirmación y la diferenciación entre las especies de *Bordetella*; motivo por el cual, sugieren emplear primers especie-específicos en el diseño in house de la PCR (CDC, 2016).

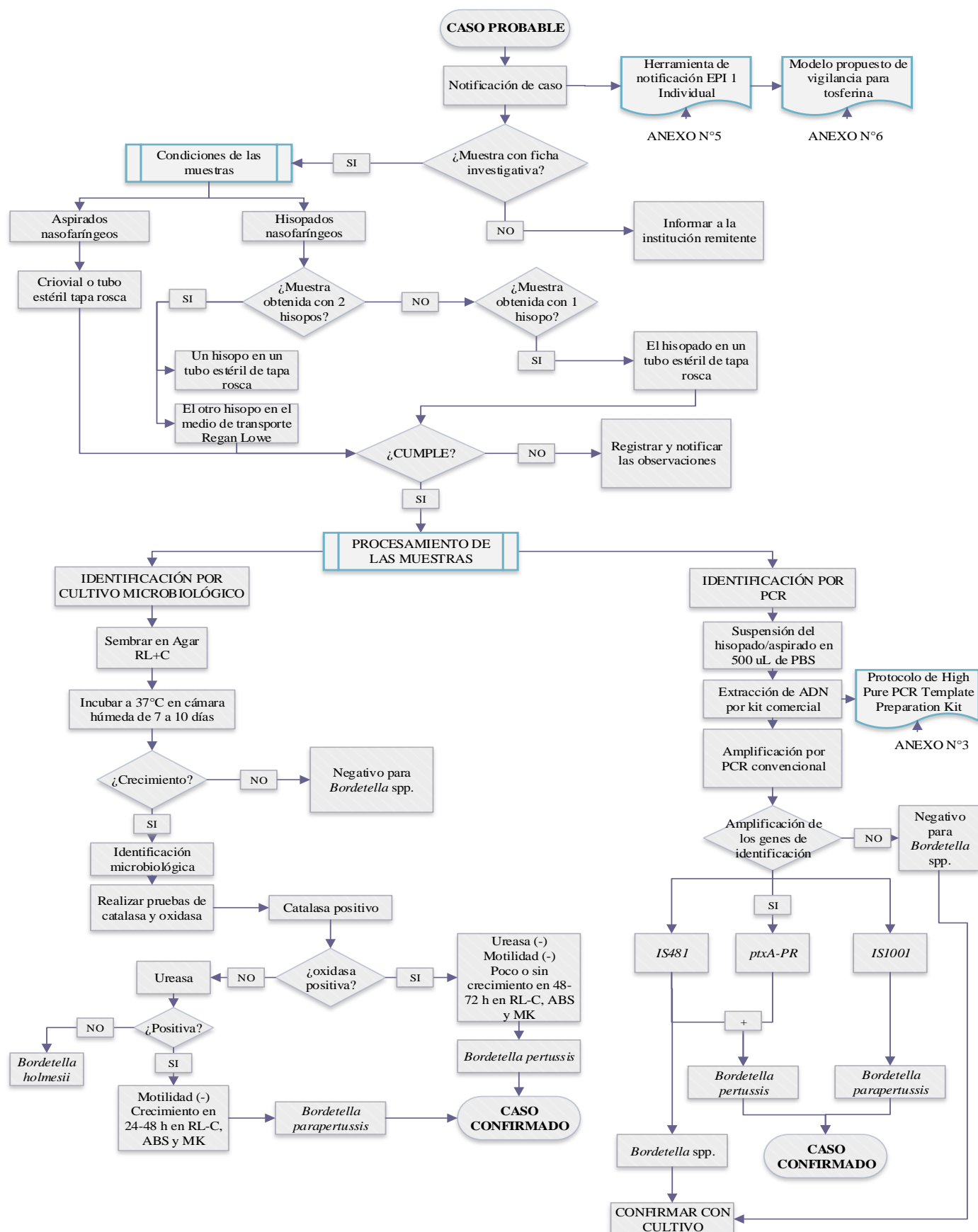


Figura 18. Algoritmo diagnóstico de laboratorio para el estudio de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* en casos probables de tosferina.

Fuente: Investigación *Elaborado por:* Saily Vásconez

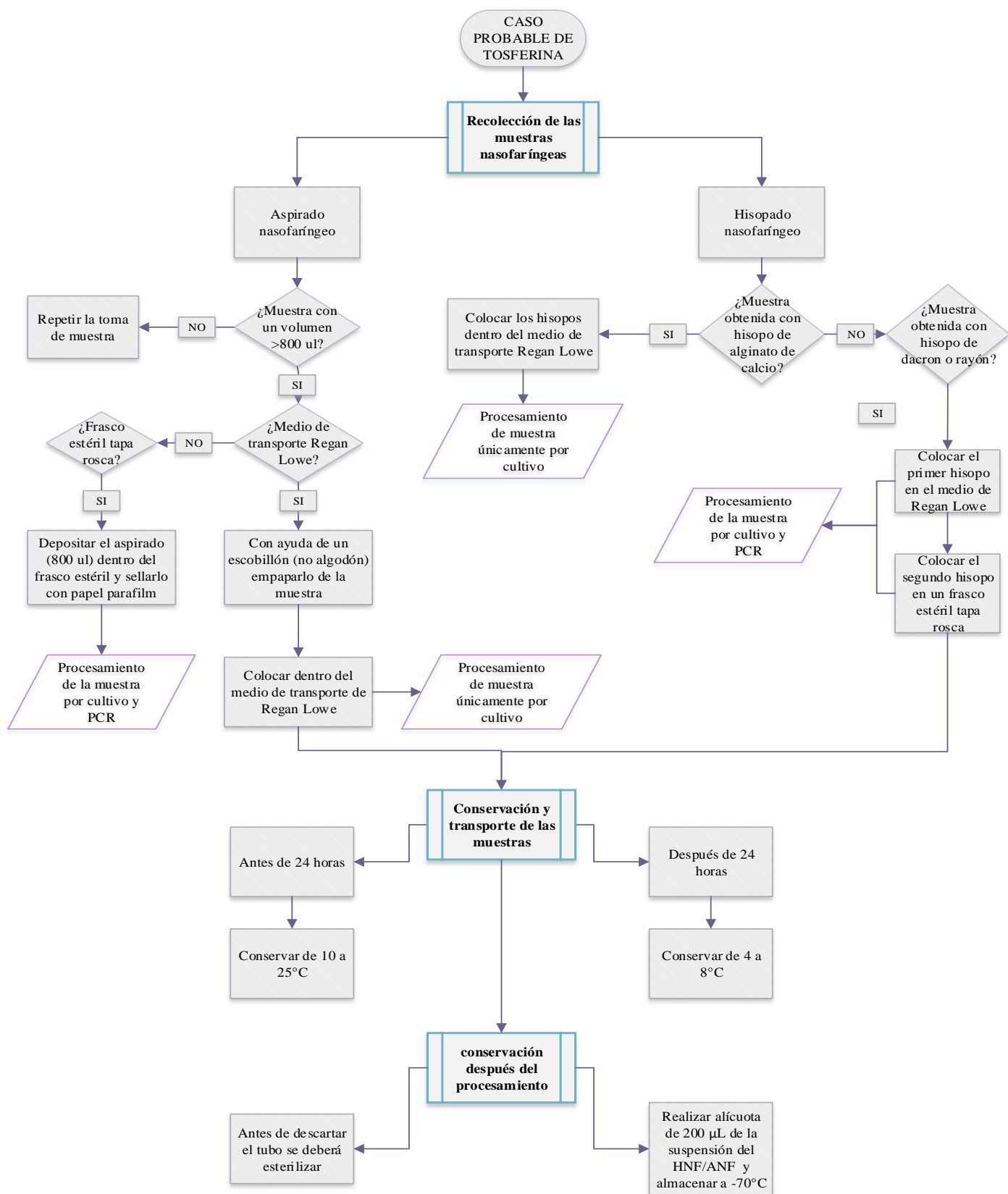


Figura 19. Condiciones de toma, transporte y conservación de muestras para diagnóstico de tosferina

Fuente: Investigación *Elaborado por:* Saidy Vásconez

CAPÍTULO V

5.1 DISCUSIÓN

La tosferina es considerada una enfermedad reemergente, debido al incremento en su incidencia pese al manejo de altas coberturas de vacunación (Moraga-Llop & Campins-Martí, 2015), que se manifiesta principalmente en lactantes de corta edad (Giménez-Sánchez et al., 2014). En este trabajo se llevó a cabo un estudio descriptivo retrospectivo en el periodo 2016 - 2017, en el cual se analizaron los datos epidemiológicos de casos sospechosos de tosferina de 12 instituciones de salud que notificaron tales eventos; la mayor frecuencia se registró de una Unidad de Salud Pediátrica al ser la población de estudio niños menores de 1 año de edad, al igual que el estudio realizado por Aveiga (2015) en la provincia del Guayas, que reporta un 47% de casos notificados por un Hospital Pediátrico.

En cuanto al sexo, existe predominio del masculino con un 55%, respecto al femenino con un 45%, sin ninguna correlación significativa, similar a los datos de Corres (2016). Sin embargo, según el estudio realizado por Pérez-Pérez et al (2015) acerca del panorama epidemiológico de la tosferina menciona que se han notificado más casos en mujeres que en hombres con una relación de 1:1.2, condición que coincide con la proporción de 0.87:1 del reporte del ECDC (2012).

El total de casos sospechosos corresponden a niños menos de 1 año de edad, con mayor frecuencia en el grupo etario de 0 a 3 meses, que representa el 65%; lo cual concuerda con varios estudios realizados en países cercanos de la región (Pérez-Pérez et al, 2015; Santos, 2015); a lo cual cabe mencionar la vacunación como factor de riesgo, sobre todo si se considera el hecho de la falta de vacunación y la vacunación incompleta para su desarrollo (Cardona, Segura, Garzón, Calle, & Agudelo, 2016). Un estudio realizado por Stefanelli (2017) menciona un mayor grado de severidad de la infección de tosferina en lactantes no vacunados, de los cuales la mediana de la edad fue de 45 días. Castillo et al (2015) en su estudio realizado en Lima-Perú reporta una incidencia de tosferina de hasta 40% en niños menores de un año de edad, similar que la tasa de este estudio.

Según el PAI, el esquema de vacunación para tosferina empieza a partir de los 2 meses de edad con la administración de la vacuna pentavalente (DPT+HB+Hib) (PAI, 2016). Las vacunas

DTP de células enteras fueron asociadas con varios eventos adversos locales, fiebre y eventos sistémicos leves; por lo que, en los Estados Unidos, la vacuna contra la tosferina recomendada para bebés y niños es la DTaP (Difteria, tétanos y pertussis acelular) (CDC, 2016).

Sin embargo, en Ecuador el Ministerio de Salud Pública administra la vacuna pentavalente y trivalente contra tosferina, compuestas de células enteras inactivas. A lo que, Brookes et al (2018) en su estudio menciona que la vacunación contra tosferina acelular puede ser menos efectiva para proporcionar una eliminación de la colonización, mientras que la vacunación a partir de células enteras puede inducir inmunidad que interfiere y reduce significativamente la colonización. No obstante, según el registro de liberación de medicamentos biológicos existen vacunas contra tosferina de tipo acelular provistas por el sector privado, conocida como Boostrix (ARCSA, 2017).

Aunque en este estudio se desconoce el estado vacunal de los menores, datos recientes sobre la vacuna de tipo acelular DTaP demuestran que posee un bajo efecto protector contra *Bordetella pertussis*, para lo que se requiere implementar estrategias de protección a las poblaciones más vulnerables (Warfel & Edwards, 2015). Plotkin (2014) en su estudio señala que la inmunización de las mujeres embarazadas podría representar una estrategia exitosa de protección a través de la transferencia de anticuerpos maternos, ya que el mayor número de casos se presenta en los primeros meses de vida.

La confirmación de laboratorio de la tosferina puede ser complejo por varias razones, entre estas la obtención de muestras inadecuadas, tiempo transcurrido entre la toma y el procesamiento, tratamiento antimicrobiano, fase de la enfermedad, medio de transporte y de cultivo específicos para *Bordetella* spp. Se evaluaron ciertos parámetros para considerar una muestra apta para el estudio; a lo cual cabe mencionar que la calidad de la muestra empieza con un adecuado proceso de colección del espécimen, tal como señalan los protocolos del CDC (2011) y corroboran estudios anteriores por Sintchenko (2008). Sin embargo, reportes de la evaluación de la estrategia nacional de inmunizaciones indican que el 80% del personal de salud no se encuentra capacitado en la toma de muestras para tosferina (PAHO, 2017).

La totalidad de muestras fueron aceptadas teniendo en cuenta el protocolo para la conservación y transporte de muestras para la investigación de tosferina, según el Ministerio de Salud Pública (SIVE, 2013). El transporte de muestras es considerado otro punto crítico del proceso, en el

estudio las muestras fueron receptadas en medio de cultivo semisólido de Regan Lowe a temperatura ambiente hasta 24 horas, de tal modo que se aseguró el crecimiento y viabilidad de la bacteria para el análisis microbiológico, lo que concuerda con los protocolos establecidos por el WHO (2014).

El Regan Lowe semisólido complementado con sangre de caballo y cefalexina es el medio de elección que sirve para el transporte, enriquecimiento e inhibición de la flora normal nasofaríngea por acción de la cefalexina, como lo descrito por Zouari, Smaoui, & Kechrid (2012). Según la guía para la vigilancia por laboratorio de *Bordetella pertussis* de Colombia establece que la temperatura de almacenamiento y transporte para procesamiento de las muestras antes de las 24 horas debe ir de 10 a 20°C (ambiente); mientras que después de las 24 horas, las muestras se deberán conservar de 4 a 8°C (INS, 2017).

Las muestras recolectadas de este estudio, en función al protocolo que maneja el Ministerio de Salud Pública del Ecuador está destinado únicamente para el análisis mediante cultivo microbiológico debido al tipo de hisopo con punta de alginato de calcio, que permite el crecimiento de *Bordetella* spp. a diferencia de los hisopos de algodón que no son recomendados ya que presentan ácidos grasos tóxicos para la bacteria, de acuerdo a lo detallado en el National Health Service of England (2014). Mientras tanto, se han descrito efectos inhibitorios en la PCR a causa de los hisopos con punta de alginato de calcio, como lo menciona Wadowsky et al, en su investigación; motivo por lo cual, no se recomienda el análisis molecular a partir de este tipo de hisopos. No obstante, en base a otros estudios, lavar el hisopo con punta de alginato de calcio en solución de PBS reduce la tasa de inhibición a un 21% (Cloud, Hymas, & Carroll, 2002); lo cual se llevó a efecto en la presente investigación. Estudios adicionales recomiendan el uso de hisopos de poliéster, como Dacron para el estudio de *Bordetella* tanto por cultivo y PCR (CDC, 2015).

Las muestras analizadas en el estudio fueron 95% hisopados y 5% aspirados nasofaríngeos, los cuales han sido descritos como los 2 métodos de preferencia para la colección de secreciones nasofaríngeas (Kerr & Matthews, 2000). Sin embargo, el CDC recomienda el aspirado nasofaríngeo con solución salina para obtener mayor cantidad de ADN bacteriano en la muestra, en especial para el estudio por PCR.

El desempeño de la técnica de cultivo microbiológico depende de varios factores, entre los que se encuentra el medio de cultivo utilizado, las condiciones de incubación y el tiempo de incubación. Para el aislamiento de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* existen medios selectivos, como el Agar Regan Lowe y el Agar Bordet Gengou (BD Systems, 2003). No obstante, Nataprawira (2015) menciona que el Agar Regan Lowe presenta una ventaja adicional con respecto al medio de Bordet Gengou, ya que este no se considera un medio selectivo y el tiempo de duración es de 1 a 2 semanas a diferencia del Regan Lowe que es estable hasta 8 semanas a 4°C.

Sin embargo, Lavayén et al (2017) menciona el uso del Agar Bordet Gengou suplementado con sangre de carnero al 10%, en condiciones de aerobiosis entre 35°C a 37°C; Bailon (2016) detalla la utilización del Agar Regan Lowe, el cual tiene como base el agar carbón (Agar Charcoal), adicionado con sangre de caballo y cefalexina (40 mg/ml), como inhibidor para suprimir bacterias de la nasofaringe, pero además se recomienda el uso del medio RL sin cefalexina, ya que algunas cepas (<10%) de *Bordetella* no crecen en RL con cefalexina, como el caso de *Bordetella holmesii* (CDC, 2014). No obstante, Nunes et al (2016) especifica que el agar Regan Lowe enriquecido con carbón vegetal más 40 mg / ml de cefalexina y 5% de sangre de caballo ha presentado buenos resultados para el aislamiento de *Bordetella* spp. a partir de muestras de aspirado e hisopado nasofaríngeo y especímenes de esputo, siendo una de las razones para la utilización del mismo en este estudio.

Entre las condiciones y el tiempo de incubación se realizó una evaluación periódica de los medios de cultivo incubados a 37°C, cada 24 horas durante 7 a 10 días para evaluar las colonias presuntivas de *Bordetella* spp. y su posterior confirmación mediante pruebas como tinción Gram, catalasa, oxidasa, urea y crecimiento en agar MK para la diferenciación entre especies, lo cual concuerda con estudios similares como Nunes et al (2016). Generalmente, *Bordetella pertussis* se detecta entre 5 a 7 días, aunque ciertas colonias pueden tardar hasta 12 días; mientras que *Bordetella parapertussis* no es tan exigente y se demora entre 3 a 5 días en desarrollarse (Leber, 2014). Sin embargo, aunque el cultivo se considere altamente específico, se requiere de varias pruebas microbiológicas complementarias, como fue detallado en el algoritmo diagnóstico de laboratorio de este estudio, en base a criterios del CDC (2015).

La proporción de positividad del cultivo nasofaríngeo en este estudio fue del 23% (20/86), considerado el método de referencia para el diagnóstico de la infección por *Bordetella*

pertussis, según lo descrito por la literatura (Dragsted, 2004; WHO, 2016), al ser altamente específico. Sin embargo, este método carece de sensibilidad, como lo refiere Gürsel (2012), indicando que el cultivo es adecuado para el diagnóstico de tosferina, principalmente en la confirmación de brotes; no obstante, la tasa de recuperación es baja en comparación con los métodos moleculares, siendo estos necesarios para un diagnóstico preciso y confiable.

Respecto al estudio molecular se identificó la presencia de *Bordetella* spp. a través de la técnica de PCR convencional por la amplificación de genes específicos del microorganismo como *IS481* y *ptxA-PR* para *Bordetella pertussis* y el gen *IS1001* para *Bordetella parapertussis* (ECDC, 2012; Castillo, 2015; Lavayén et al., 2017). Esta técnica molecular presentó una proporción de positividad del 41% (35/86), determinando una sensibilidad considerable del 79%, tomando como método de comparación la técnica de cultivo, mientras que estudios como el de Dragsted (2004) indica una sensibilidad del 97% en la PCR, pese a que Farías (2015) reporta una sensibilidad del 50%, siendo más baja que la sensibilidad obtenida en esta investigación. En cuanto a la especificidad, en el estudio corresponde al 71%, mientras que Dragsted (2004) y Farías (2015) reportan una especificidad del 93 y 84%, respectivamente.

Existe ciertas variaciones entre los porcentajes de sensibilidad y especificidad reportados en el estudio, a causa de la discrepancia presente en 4 muestras (falsos negativos) que fueron positivas para *Bordetella pertussis* mediante cultivo, pero negativas por PCR convencional, lo cual plantea interrogantes sobre la presencia de polimorfismos en el ADN diana de dichas muestras, según el estudio de Glare (1990) o interferencias debido al tipo de hisopo con punta de alginato de calcio, asociado a inhibición de la PCR, como refiere Wadowsky et al (1994) y Cloud (2002) en sus investigaciones; además, se ha considerado posibles interferencias propias de las muestras nasofaríngeas y del medio de transporte en que se encontraban, lo cual no favoreció para obtener ADN de óptima calidad. Mientras que el porcentaje de los falsos positivos respecto a los verdaderos positivos se atribuye a la baja sensibilidad que presenta el cultivo en la detección de *Bordetella* spp. (Lingappa et al, 2002; Farías, 2015).

No obstante, la sensibilidad y especificidad hallada para la PCR convencional demuestra una mayor capacidad para la detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, aunque es necesario complementar el diagnóstico con el método Gold estándar (Sanz, 2002; CDC, 2017). Mattoo & Cherry (2005) indican que se obtiene una mayor sensibilidad cuando se complementa el cultivo con la PCR y pruebas serológicas.

Cabe recalcar que estos hallazgos de sensibilidad y especificidad no se deben generalizar para todas las pruebas de identificación de *Bordetella* spp. disponibles comercialmente, ya que este estudio se lo realizó en función de un protocolo del ECDC, pero utilizando un kit comercial para uso investigativo (TibMolbiol LightMix® *Bordetella pertussis* y *parapertussis*). No obstante, Lanotte et al (2011) en su estudio evaluó ciertos kits comerciales destinados al diagnóstico in vitro de *Bordetella*, mostrando que los ensayos de Simplexa *Bordetella pertussis* / *parapertussis* de Focus Diagnostics, SmartCycler *Bordetella pertussis* / *parapertussis* de Cepheid y de Bordetella R-gene de Argene presentaron una sensibilidad mayor al 90% en la identificación de dichos microorganismos.

El gen *IS481* ha sido descrito por varios autores como el blanco para la identificación de *Bordetella pertussis* (Hasan, 2014; Kolodkina, 2014). No obstante, también se encuentra asociado a una infección ocasionada por *Bordetella holmesii*, por lo cual se recomienda la evaluación de blancos específicos, el gen de la toxina pertussis (*ptxA*) para *Bordetella pertussis* y el gen *hIS1001* para *Bordetella holmesii* (Lotfi, 2016). En este estudio el 39% (34/86) de las muestras dio un resultado positivo para los genes *IS481* y *ptxA-PR* y se consideró positivo para *Bordetella pertussis*, de acuerdo con el estudio de Castillo (2015); mientras que el gen *IS1001* específico de *Bordetella parapertussis* amplificó únicamente en una muestra, que además fue positiva para el *IS481* siendo considerada como co-infección; sin embargo, Petridou et al (2018) reporta que en su estudio aquellas muestras que fueron positivas tanto para *IS481* como para *IS1001* se designaron como *Bordetella bronchiseptica*.

Las distintas metodologías utilizadas para la confirmación de tosferina permitieron ampliar el periodo en el cual la enfermedad fue detectada en comparación con el tiempo de detección de una prueba empleada de forma aislada. En el estudio, la media del tiempo de evolución de la enfermedad al momento de la toma y procesamiento de las muestras para los casos confirmados por cultivo fue 10 días, en un rango de 1 a 20 días; datos semejantes a los reportados por Lavayén et al (2017), en donde se menciona que la media del tiempo de evolución de síntomas con respecto a la toma de muestra de los casos con cultivo positivo fue $6,3 \pm 4,2$ días y un rango de 1 a 15 días.

De modo que, varias organizaciones de salud como el Departamento de Salud de Minnesota indican que el tiempo óptimo para la confirmación por cultivo se lo debe realizar a partir de las

muestras recogidas durante las 2 primeras semanas del inicio de síntomas. (Miller & Ersted, 2016). Leber (2014) en su estudio menciona que el cultivo presenta una sensibilidad del 12 - 60%, si el análisis se realiza al comienzo de la enfermedad (<2 semanas). Es decir, en el periodo catarral de los síntomas donde existe mayor carga bacteriana, lo cual favorece al diagnóstico mediante cultivo.

Lee et al (2018) señala que en su estudio la sensibilidad del cultivo y la PCR disminuyeron del 70% y 80%, respectivamente, a un 10% y 21%, después de la segunda semana del inicio de los síntomas. Mientras que Santos (2012) reporta que la sensibilidad del cultivo nasofaríngeo en su estudio fue del 11,35%, si la muestra era tomada en los primeros catorce días del inicio de los síntomas, lo cual coincide con lo esperado y lo descrito en la literatura; y sólo 1,59% de los casos fue positivo después de las primeras dos semanas de síntomas.

El tratamiento antibiótico previo a la obtención del espécimen desempeña otro punto crucial en el diagnóstico ya que puede generar falsos negativos; sin embargo, en la detección mediante PCR en tiempo real, este criterio no afecta los resultados, como lo explica Mahmoudi et al (2018), donde el 80% de sus pacientes habían usado antibiótico previo al muestreo. En vista de que ningún método para la detección de *Bordetella* spp. es óptimo en todas las fases de la enfermedad, ha sido recomendado la combinación del cultivo, PCR y serología para reforzar el sistema de vigilancia en la confirmación de tosferina (Pinell-McNamara et al., 2017).

Puesto que las técnicas de PCR representan una alternativa muy prometedora para la detección de *Bordetella* spp, la PCR en tiempo real ha sustituido a la PCR convencional debido a innumerables ventajas, al ser la PCR en tiempo real al menos 10 veces más sensible que la PCR convencional, de acuerdo con estudios desarrollados por el CDC, pero la estandarización de este método sigue siendo problemática (Kolodkina, 2013). Estudios como el de Fry et al (2004) mencionan que la mejor manera de garantizar la fiabilidad de los resultados de la PCR en tiempo real se enfoca en determinar la calidad de las muestras extraídas, probar la inhibición de la PCR a través de un control interno y emplear muestras independientes o no relacionadas, acorde a lo que se desarrolló en la presente investigación.

El kit de amplificación empleado se basó en la caracterización de dos secuencias, el gen *IS481* y el gen *IS1001* para identificación a nivel de especie del género *Bordetella*. Sin embargo, se ha descrito en la literatura que la región *IS481* presenta una alta sensibilidad analítica, pero baja

especificidad (Sanden, 2006; Hasan, 2014). No obstante, Kolodkina (2014) describe en su estudio que el ensayo multiplex en tiempo real mediante los genes *IS481* e *IS1001* proporciona una forma efectiva para detectar y diferenciar entre *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*. Aunque Petridou et al (2018) en su estudio realiza la identificación de especies mediante dichos genes (*IS481/IS1001*), adicionalmente emplea el gen *ptxA-Pr* para la confirmación de especie en las muestras positivas. Incluso el CDC desarrolló un ensayo de PCR multitarget para diferenciar entre *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii*, a través de secuencias especie-específicas de cada una (CDC, 2016).

El gen *IS481* está presente en 50 a 238 copias en *Bordetella pertussis*, lo que le hace un buen candidato para el diseño de una PCR de alta sensibilidad (Aquino, 2011). Sin embargo, la especificidad se reduce debido a la presencia de *IS481* en *Bordetella holmesii* y algunos aislados de *Bordetella bronchiseptica*. Debido al alto número de copias de *IS481* presentes en *Bordetella pertussis*, el ECDC (2012) recomienda tomar en consideración el número de ciclos de PCR necesarios para que una reacción cruce el umbral. Un valor alto de Ct puede ser un verdadero positivo, indicativo de infección por *Bordetella pertussis*, pero también puede ser un falso positivo, indicativo de contaminación cruzada de ADN. En este estudio, se obtuvieron muestras con un CP ≤ 30 , dentro de los rangos establecidos por la curva de estándares.

No obstante, los resultados de la amplificación por PCR en tiempo real presentaron varias incongruencias, dado que el 99% de las muestras resultaron positivas para *Bordetella pertussis* al amplificar el gen *IS481*, abriendo un sin número de interrogantes para descartar posibles falsos positivos. Según la normativa del proyecto de pertussis en Latinoamérica se evaluaron los controles de extracción, controles no relacionados, controles negativos y positivos, a fin de demostrar su validación (CDC, 2017). Sin embargo, estudios apuntan que los resultados falsos positivos se deben al blanco de identificación, es decir el gen diana utilizado para la diferenciación de las especies de *Bordetella*, como describe Muyldermans et al. (2005) donde además mencionan la falta de homogeneidad y estandarización de los protocolos de PCR.

Inicialmente, se discutió acerca de una muestra que fue positiva por PCR convencional para los 2 genes de estudio, el gen *IS481* e *IS1001*, siendo candidata a una posible co infección; cuyo resultado por PCR en tiempo real probó lo obtenido, es decir la muestra fue positiva tanto para *Bordetella pertussis* como para *Bordetella parapertussis*. Sin embargo, según el inserto del kit de amplificación empleado en la técnica de PCR en tiempo real sugiere que, si una

muestra resulta positiva para ambos genes, puede ser co infección o sugestiva de *Bordetella bronchiseptica*, lo cual corrobora Petridou et al (2018) en su estudio, reportando como *Bordetella bronchiseptica* a aquellas muestras positivas para *IS481* e *IS1001*. Esto se sospecha dado que el genoma de *Bordetella bronchiseptica* contiene copias de la secuencia *IS481*, así como de la secuencia *IS1001* (Tozolova, 2012; van der Zee, et al., 2015); mientras que, el CDC (2010) a través de una PCR multitarget identifica co-infección entre *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* cuando se expresan los genes *IS481*, *IS1001* e *ptxS1*.

Worthington et al (2012) en su estudio demostró que la infección por *Bordetella pertussis* aumenta la capacidad de *Bordetella parapertussis* para colonizar el mismo huésped originando una infección mixta. No obstante, aunque tanto *Bordetella pertussis* como *Bordetella parapertussis* ocasionan manifestaciones clínicas similares, la diferenciación a nivel de especie es importante para conocer la situación epidemiológica del país, puesto que la vacuna disponible sólo es activa frente a la toxina pertussis; es decir para *Bordetella pertussis* (Qin, 2015).

5.2 CONCLUSIONES

La frecuencia de *Bordetella pertussis* detectada a partir de muestras nasofaríngeas fue del 41% mediante la técnica de PCR convencional, mayor a la frecuencia registrada por cultivo microbiológico del 23%; mientras que *Bordetella parapertussis* no fue aislada por cultivo, pero mediante PCR convencional y PCR en tiempo real se obtuvo un caso probable de co-infección por ambos microorganismos.

De la misma manera, se registró mayor frecuencia de casos sospechosos de tosferina para el rango de edad de 0 a 3 meses, que representa el 65% con predominio del sexo masculino con un 55% y mayor número de casos notificados por parte de una Institución de Salud Pediátrica de la ciudad de Quito.

La relación entre la técnica de cultivo y PCR convencional indica un aumento de sensibilidad de la prueba molecular respecto al cultivo; así la PCR convencional a través de la amplificación de los genes *IS481*, *ptxA-Pr* e *IS1001* revelan una sensibilidad del 79% y especificidad del 71% para la detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* en comparación con la técnica de cultivo que presenta una tasa de recuperación del 23%.

Se encontró relación estadísticamente significativa entre la fase de la enfermedad (paroxística) de 1 a 15 días y la detección mediante cultivo; mientras que la detección por PCR convencional no presentó variación debido a que el tiempo de inicio de síntomas y el análisis no superó los 22 días, mostrando una distribución normal.

Al ser *Bordetella pertussis* un organismo de crecimiento lento se necesitan ensayos que no se basen sólo en microorganismos viables, ya que la sensibilidad del cultivo se ve afectado por una serie de factores como el estado de vacunación, tratamiento antibiótico, etapa de la enfermedad y tipo de muestra afectando el desempeño de este método.

En la evaluación de los ensayos de PCR en tiempo real muestran una elevada sensibilidad en la detección de mínimas cantidad de ADN bacteriano a partir de muestras nasofaríngeas, pero también demuestra el alto riesgo de obtener falsos positivos debido al blanco de identificación o por contaminación cruzada.

Si bien es cierto, a nivel mundial existen varios protocolos de PCR destinados a la detección de especies de *Bordetella*, la implementación de una prueba molecular tanto convencional como en tiempo real necesita consolidarse dentro de un laboratorio de Referencia Nacional a través de protocolos estandarizados que mantengan directrices definidas por el CDC.

Además, se requiere la amplificación de 4 regiones del genoma *IS481*, *ptxA-Pr*, *IS1001* e *hIS1001* para mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular. En el contexto de salud pública, se necesita de un alto grado de especificidad para evitar intervenciones innecesarias e ineficaces.

No obstante, el diagnóstico del síndrome coqueluche o sospecha de tosferina debe residir en el uso combinado de varios métodos diagnósticos, para lo cual se propuso el algoritmo diagnóstico de laboratorio basado en la práctica y en la literatura.

5.3 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios epidemiológicos que permitan evaluar el estado de vacunación del paciente y administración de antibióticos con la finalidad de determinar factores de riesgo que afecten en la detección de *Bordetella* spp.

Dar continuidad con estudios posteriores acerca de la detección de dichos microorganismos mediante pruebas serológicas, recomendadas para las fases tardías de la enfermedad que permitan apreciar el estado inmunológico de cada paciente. Así como estudios de caracterización de las cepas de *Bordetella pertussis* a través de PFGE para evaluar clonalidad de las cepas circulantes.

En cuanto a la fase pre analítica de recolección, toma y transporte de muestras es necesario que el ministerio de salud pública adopte los criterios establecidos por el CDC, como organismo regular para un adecuado manejo de los casos sospechosos de tosferina.

De igual manera, es necesario un estudio sobre el tipo de hisopos de alginato de calcio empleados para el estudio de *Bordetella* spp. y analizar el grado de inhibición de la PCR. Además, para estandarizar la técnica de PCR en tiempo real es necesario contar con buenas prácticas de laboratorio en la preparación de reactivos (mastermix), extracción de ADN, preparación de la placa; así como contar un kit de amplificación multitarget validado para el diagnóstico de tosferina a través de la caracterización de varias secuencias de *Bordetella*.

Debido a la inminente necesidad y desafío que presenta el INSPI como Laboratorio de Referencia Nacional para la confirmación de tosferina se recomienda considerar la opción del algoritmo diagnóstico de laboratorio propuesto y emplearlo en la vigilancia de la enfermedad, cumpliendo las condiciones apropiadas para el procesamiento de las muestras y así eliminar las posibles interferencias que se presentaron en la presente investigación

BIBLIOGRAFÍA

- Altunaiji, S. M., Kukuruzovic, R. H., Curtis, N. C., & Massie, J. (2007). Antibiotics for whooping cough (pertussis). In The Cochrane Collaboration (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004404.pub3>
- Aspectos genómicos de Bordetella. (2011). *SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INFECTOLOGÍA*, 24(96), 139–146.
- Aveiga Suarez, G. P. (2015). *Análisis de la situación epidemiológica de la tosferina en guayas años 2008-2013*. Universidad de Guayaquil. Facultad Piloto de Odontología. Escuela de Postgrado “Dr. José Apolo Pineda.”
- Bailon, H., León-Janampa, N., Padilla, C., & Hozbor, D. (2016). Increase in pertussis cases along with high prevalence of two emerging genotypes of Bordetella pertussis in Perú, 2012. *BMC Infectious Diseases*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1700-2>
- Bergfors, E., Trollfors, B., Taranger, J., Lagergard, T., Sundh, V., & Zackrisson, G. (1999). Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *International Journal of Infectious Diseases*, 3(3), 140–146.
- Black, R. E., Cousens, S., Johnson, H. L., Lawn, J. E., Rudan, I., Bassani, D. G., ... others. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The Lancet*, 375(9730), 1969–1987.
- Bowden, K. E., Williams, M. M., Cassiday, P. K., Milton, A., Pawloski, L., Harrison, M., ... Tondella, M. L. (2014). Molecular Epidemiology of the Pertussis Epidemic in Washington State in 2012. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(10), 3549–3557. <https://doi.org/10.1128/JCM.01189-14>
- Cano-Rangel, M. A., Durazo-Arvizu, M. de L. Á., Dorame-Castillo, R., & Gómez-Rivera, N. (2012). Abordaje Diagnóstico del Síndrome Coqueluchoide y Tosferina. *Boletín Clínico Hospital Infantil Del Estado de Sonora*, 29(2), 85–87.

- Cardona, D., Segura, Á., Garzón, M. O., Calle, M., & Agudelo, M. C. (2016). Tendencia de la mortalidad y morbilidad por tos ferina en Colombia 2002-2012. *Biomédica*, 36(3). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3117>
- Castillo, M. E., Bada, C., del Aguila, O., Petrozzi-Helasvuo, V., Casabona-Ore, V., Reyes, I., & del Valle-Mendoza, J. (2015). Detection of *Bordetella pertussis* using a PCR test in infants younger than one year old hospitalized with whooping cough in five Peruvian hospitals. *International Journal of Infectious Diseases*, 41, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.10.020>
- Centros para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC). Pertussis Outbreaks. Disponible en: <http://www.cdc.gov/pertussis/outbreaks.html>
- Cherry, J. D., & Seaton, B. L. (2012). Patterns of *Bordetella parapertussis* Respiratory Illnesses: 2008-2010. *Clinical Infectious Diseases*, 54(4), 534–537. <https://doi.org/10.1093/cid/cir860>
- Cloud, J. L., Hymas, W., & Carroll, K. C. (2002). Impact of Nasopharyngeal Swab Types on Detection of *Bordetella pertussis* by PCR and Culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3838–3840. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3838-3840.2002>
- Corres, M. E. (2016). Características epidemiológicas y factores asociados a la evolución de la Coqueluche en niñas y niños menores de 1 año atendidos en el hospital infantil municipal de Córdoba. *Córdoba-Argentina*, 9-12.
- Diavatopoulos, D. A., Cummings, C. A., van der Heide, H. G. J., van Gent, M., Liew, S., Relman, D. A., & Mooi, F. R. (2006). Characterization of a Highly Conserved Island in the Otherwise Divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* Genomes. *Journal of Bacteriology*, 188(24), 8385–8394. <https://doi.org/10.1128/JB.01081-06>
- Dierig, A., Beckmann, C., & Heininger, U. (2015). Antibiotic Treatment of Pertussis: Are 7 Days Really Sufficient? *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(4), 444–445. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000567>

- Dotres Martínez, C., Vega Mendoza, D., Toraño Peraza, G., Álvarez Carmenate, M., & Broche Morera, A. (2012). Síndrome coqueluchoide y tos ferina. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 28(4), 725–734.
- Dragsted, D. M. (2004). Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *Journal of Medical Microbiology*, 53(8), 749–754. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45585-0>
- European Union, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). *Annual epidemiological report: reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data: 2012*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- ECDC. (2012). Guidance and protocol for the use of realtime PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *parapertussis*. *EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL- TECHNICAL DOCUMENT*.
- Expósito, N., Martínez, E., Alvarez, G., Riera, V., Proaño, H., García, S., ... others. (2015). Pre-formulation study of a pentavalent DTP-HB-Hib vaccine obtained in Ecuador. *Biotechnol Apl*, 32(4), 4251–61.
- Faulkner, A., Skoff, T., Martin, S., Cassiday, P., Tondella, M. L., Liang, J., & Ejigiri, G. (2011). Pertussis. *VPD Surveillance Manual*, 1–12.
- Ferina, G. de E. en V. contra T. (2011). Consenso para el diagnóstico clínico y microbiológico y la prevención de la infección por *Bordetella pertussis*. *Salud Pública de México*, 53(1).
- Fernández Cano, M. I., Campins Martí, M., & Armadans, L. (2016). Comparación de la incidencia de tos ferina declarada con la incidencia de hospitalización por tos ferina en España.
- Garcia-Martinez, J., Chaves, F., Salto, E., & Otero, J. R. (2006). *Bordetella pertussis* detection by real-time PCR, immunofluorescence and culture: prospective evaluation and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clinica*, 24(8), 500–504.
- Gentile, Á. (2010). Infección por *Bordetella pertussis*. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 108(1), 78–81.

- Giménez-Sánchez, F., Cobos-Carrascosa, E., Sánchez-Forte, M., López-Sánchez, M. Á., González-Jiménez, Y., & Azor-Martínez, E. (2014). Diferencias clínicas y epidemiológicas entre las infecciones por *Bordetella pertussis* y por virus respiratorio sincitial en lactantes: estudio de casos controles emparejados. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(6), 359–362. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.06.003>
- Gómez Rivera, N., García Zarate, M., Álvarez Hernández, G., Villalobos García, L., Fonseca Chon, I., & López Miranda, A. (2011). Tos Ferina y Síndrome Coqueluchoide en Niños Menores de 1 Año de Edad: Factores de Riesgo Asociada a Mortalidad. Estudio Transversal Descriptivo de 48 Casos. *Boletín Clínico Hospital Infantil Del Estado De Sonora [Revista En Internet]*, 2–6.
- González Hermida, A., Costa Cruz, M., & Castañeda Álvarez, E. (2014). Síndrome de Coqueluche. Presentación de un caso. *MediSur*, 12(5), 736–740.
- Grogan, J. A., Logan, C., O’Leary, J., Rush, R., & O’Sullivan, N. (2011). Real-time PCR-based detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an Irish paediatric population. *Journal of Medical Microbiology*, 60(6), 722–729. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.030049-0>
- Guris D, Strebel PM, Jafari H, Wharton M, Hadler SC. 1997. Pertussis vaccination: use of acellular pertussis vaccines among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 46:125.
- Heininger, U., Cherry, J. D., Stehr, K., Schmitt-Grohé, S., Überall, M., Laussucq, S., ... Group, P. V. S. (1998). Comparative efficacy of the Lederle/Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine and Lederle whole-cell component DTP vaccine in German children after household exposure. *Pediatrics*, 102(3), 546–553.
- Kerr, J. R., & Matthews, R. C. (2000). *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(2), 77–88.

- Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J., & Schmitt, H.-J. (2016). Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 449–486. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
- Lavayén, S., Zotta, C., Cepeda, M., Lara, C., Rearte, A., & Regueira, M. (2017). Infección por *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* en casos con sospecha de coqueluche (2011-2015). Mar del Plata, Argentina. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 34(1), 85. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.341.2770>
- Leber, A. L. (2014). Pertussis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 34(2), 237–255. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.02.003>
- Ledermann, D. (2004). Breve historia de la *Bordetella pertussis*, una elusiva damisela. *Revista Chilena de Infectología*, 21(3), 241–246.
- Lee AD, Cassiday PK, Pawloski LC, Tatti KM, Martin MD, et al. (2018) Clinical evaluation and validation of laboratory methods for the diagnosis of *Bordetella pertussis* infection: Culture, polymerase chain reaction (PCR) and anti-pertussis toxin IgG serology (IgG-PT). *PLOS ONE* 13(4): e0195979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195979>
- Leite, D., Morozetti Blanco, R., Cecilia Vieira de Melo, L., Eduardo Fiorio, C., Moura Martins, L., Mara Ibelli Vaz, T., ... Tavares Sacchi, C. (2013). Implementation and Assessment of the Use of Real-Time PCR in Routine Diagnosis for *Bordetella pertussis* Detection in Brazil. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 2(4), 196–202. <https://doi.org/10.5812/pedinfect.12505>
- Mahmoudi, S., Banar, M., Pourakbari, B., Alavi, H. S., Eshaghi, H., Ahari, A. A., & Mamishi, S. (2018). Identification of Etiologic Agents of the Pertussis-like Syndrome in Children by Real-time PCR Method. *Prague Medical Report*, 119(1), 61–69. <https://doi.org/10.14712/23362936.2018.6>
- Marcon, M. J., Hamoudi, A. C., Cannon, H. J., & Hribar, M. M. (1987). Comparison of throat and nasopharyngeal swab specimens for culture diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(6), 1109–1110.
- Mattoo, S., & Cherry, J. D. (2005). Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other

- Bordetella Subspecies. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 326–382. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.326-382.2005>
- Miller, C., & Ersted, S. (2016). Pertussis Laboratory Testing. -Minnesota. Dept. of Health. <http://www.health.state.mn.us/pertussis>
- Ministerio de Salud Pública. Manual de procedimientos del Subsistema alerta acción SIVE – ALERTA. Quito: Segunda edición, MSP; 2013. Disponible en: <http://salud.gob.ec>
- Montilla-Escudero, E. A., Rojas-Baquero, F., & Ulloa-Virguez, A. P. (2016). Concordancia entre las técnicas de IFD, PCR y ELISA para determinar la frecuencia de Bordetella parapertussis y Bordetella pertussis en un brote de tos ferina en el departamento de Antioquia (Colombia) en 2013. *Infectio*, 20(3), 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.10.001>
- Mooi, F. R., Bruisten, S., Linde, I., Reubsaet, F., Heuvelman, K., van der Lee, S., & J. King, A. (2012). Characterization of Bordetella holmesii isolates from patients with pertussis-like illness in the Netherlands. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 64(2), 289–291. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00911.x>
- Moraga-Llop, F. A., & Campins-Martí, M. (2015). Vacuna de la tos ferina. Reemergencia de la enfermedad y nuevas estrategias de vacunación. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(3), 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.02.001>
- Moreno Samos, M., Amores Torres, M., Pradillo Martín, M. C., Moreno-Pérez, D., Cordon Martínez, A., Urda Cardona, A., & Ramos Fernández, J. M. (2015). Incidencia y gravedad de la tosferina en lactantes coinfectados por el virus respiratorio sincitial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(7), 476–479. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.09.009>
- Murray, Ronsenthal, & Pfaller. (2014). Bordetella. En Murray, *Microbiología médica*. Elsevier.
- Muyldermans, G., Soetens, O., Antoine, M., Bruisten, S., Vincart, B., Doucet-Populaire, F., ... Lauwers, S. (2005). External Quality Assessment for Molecular Detection of Bordetella pertussis in European Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 30–35. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.30-35.2005>

- Nataprawira, H. M. (2015). A retrospective study of acute pertussis in Hasan Sadakin Hospital - Indonesia. *Journal of Acute Disease*, 147-151.
- Nunes, M. C., Soofie, N., Downs, S., Tebeila, N., Mudau, A., de Gouveia, L., & Madhi, S. A. (2016). Comparing the Yield of Nasopharyngeal Swabs, Nasal Aspirates, and Induced Sputum for Detection of *Bordetella pertussis* in Hospitalized Infants. *Clinical Infectious Diseases*, 63(suppl 4), S181–S186. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw521>
- Organization, W. H. (2014). Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by bordetella pertussi.
- Organización Panamericana de la Salud. (1992). *Infecciones respiratorias agudas en los niños: tratamiento de casos en hospitales pequeños*. Washington: Organización Panamericana de la Salud.
- OPS/OMS. (2017). Evaluación de la Estrategia Nacional de Inmunizaciones, Quito-Ecuador. Extraído de http://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_docman&view=download&alias=673-evaluacion-de-la-estrategia-nacional-de-inmunizaciones-ecuador-2017&category_slug=inmunizaciones&Itemid=599.
- Ovalles, Y. B., & Velásquez, J. N. (2015). Infecciones respiratorias virales en pediatría: generalidades sobre fisiopatogenia, diagnóstico y algunos desenlaces clínicos. *Revista Médicas UIS*, 28(1), 133–141.
- Pan American Health Organization. (2005). *Control of diphtheria, pertussis, tetanus, haemophilus influenzae type B, and hepatitis B: field guide*. Washington, D.C.: Pan American Health Organization : World Health Organization.
- Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. E., ... Maskell, D. J. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetics*, 35(1), 32–40. <https://doi.org/10.1038/ng1227>
- Pérez, D. M., Artigao, F. B., de Liria, C. R. G., & Ortega, M. C. (n.d.). Tos ferina. Retrieved from

<http://www.enfermeriaaps.com/portal/download/INFECTOLOGIA/Protocolos%20Infectologia%20AEP%202011/Tos%20ferina.pdf>

- Pérez-Pérez, G. F., Rojas-Mendoza, T., Cabrera-Gaytán, D. A., & Grajales-Muñiz, C. (2015). Pertussis in Mexico, an epidemiological overview. A study of 19 years at the Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 53(2), 164.
- Pfaller, M. A., Richter, S. S., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Carroll, K. C., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition*. American Society of Microbiology. Retrieved from <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381>
- Pinell-McNamara, V. A., Acosta, A. M., Pedreira, M. C., Carvalho, A. F., Pawloski, L., Tondella, M. L., & Briere, E. (2017). Expanding Pertussis Epidemiology in 6 Latin America Countries through the Latin American Pertussis Project. *Emerging Infectious Diseases*, 23(13). <https://doi.org/10.3201/eid2313.170457>
- Plotkin, S. A. (2014). Pertussis: pertussis control strategies and the options for improving current vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 13(9), 1071–1072. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.944166>
- Public Health England. (2016). Guidelines for the Public Health Management of Pertussis in England. *Public Health England*.
- Reyes, M. P. (2016). Factores de Riesgo para Infecciones Respiratorias Agudas en Niños Menores de 1 año. CS Santa Fe-Callao. 2014. *Revista Peruana de Obstetricia Y Enfermería*, 11(1). Retrieved from <http://www.aulavirtualusmp.pe/ojs/index.php/rpoe/article/view/735>
- Sanden, G. N., & Weyant, R. S. (2015). *Bordetella*. In W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, ... S. Dedysh (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–20). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118960608.gbm00928>
- Santos García, J. (2015). Perfil clínico y epidemiológico de la tosferina en El Salvador, año 2012. *UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA*, 11-13.

- Stefanelli, P., Buttinelli, G., Vacca, P., Tozzi, A. E., Midulla, F., Carsetti, R., ... Group, P. S. (2017). Severe pertussis infection in infants less than 6 months of age: Clinical manifestations and molecular characterization. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(5), 1073–1077.
- Tan, T., Trindade, E., & Skowronski, D. (2005). Epidemiology of Pertussis: *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24(Supplement), S10–S18. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000160708.43944.99>
- Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., van der Zee, A., Diederén, B. M. W., Kruijsen, A. M., Goossens, H., ... Claas, E. C. J. (2003). Evaluation of Real-Time PCR for Detection of and Discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for Clinical Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4121–4126. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4121-4126.2003>
- Tille, P. M. (2014). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (Thirteenth edition). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Torres, J., Naranjo, L., & Suarez, J. (2015). Epidemiological situation of pertussis in Venezuela: tendencies over the last two decades. *Revista Panam Infectología*, 17(1), 42-49.
- van der Zee, A., Schellekens, J. F. P., & Mooi, F. R. (2015). Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), 1005–1026. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-15>
- Vittucci, A. C., Spuri Vennarucci, V., Grandin, A., Russo, C., Lancella, L., Tozzi, A. E., ... Villani, A. (2016). Pertussis in infants: an underestimated disease. *BMC Infectious Diseases*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1710-0>
- Warfel, J. M., & Edwards, K. M. (2015). Pertussis vaccines and the challenge of inducing durable immunity. *Current Opinion in Immunology*, 35, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.05.008>
- WHO. (2012). Alerta Epidemiológica Tos Ferina (Coqueluche). Disponible en http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=19325&lang=es

World Health Organization. WHO. Recommendations for Routine immunization – summary tables. 2012 [cited 2017 May 10]. Available from: http://www.who.int/immunization/policy/immunization_tables/en/

Woolfrey, B. F., & Moody, J. A. (1991). Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3), 243–255.

ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprobación del trabajo de investigación por el Comité de Bioética de Investigación en Seres Humanos de la PUCE

**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**
Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos



Quito, 07 de diciembre de 2017
Oficio-CEISH-397-2017

Señorita
Saidy Liceth Vásquez Noguera
Carrera de Bioquímica Clínica
Facultad de Medicina de la PUCE
Presente.

Estimada Srta. Vásquez:

El Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE, en sesión del 16.11.2017, estudió el proyecto intitulado: **"Identificación de Bordetella pertussis y B. parapertussis a partir de muestras nasofaríngeas preservadas en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, mediante cultivo y CPR en tiempo real, 2018"**.

El proyecto está bien presentado, por lo tanto, se aprueba.

Deseamos éxitos en su investigación.

Con nuestra consideración y estima,


Dra. Laura Arcos Terán
Presidenta
Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos - PUCE



LAT/yar

Av. 12 de octubre 1076 y Ramón Roca
Apartado postal 17-03-2184
Telf. (593) 2 299 17 00 ext. 2917
Quito - Ecuador



Anexo 2. Protocolo de microbiología para la identificación de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* mediante cultivo y pruebas microbiológicas

1. Procesamiento de las muestras nasofaríngeas
 - 1.1. Inoculo de los hisopados nasofaríngeos de la fosa derecha e izquierda en Agar Regan Lowe más cefalexina.
 - 1.2. Siembra por agotamiento e incubar a 37°C en atmósfera húmeda.
 - 1.3. Observar crecimiento cada 24 horas durante 7 a 10 días.
2. Evaluación de las colonias presuntivas en el medio de cultivo
 - 2.1. Evaluar la morfología macroscópica de las colonias como convexas, redondas bien definidas, brillosas, similares a una gota de agua.
 - 2.2. Evaluar la morfología microscópica mediante tinción de Gram como coco-bacilos gram negativos.
3. Verificación a través de las pruebas microbiológicas
 - 3.1. Prueba de oxidasa en disco
 - 3.2. Prueba de catalasa
 - 3.3. Siembra en Agar MacConkey
 - 3.4. Siembra en medio de urea
4. Análisis de los resultados para la diferenciación entre especies de *Bordetella*

Test/ Especie	Tinción de Gram	Oxidasa	Catalasa	Urea	MacConkey
<i>Bordetella pertussis</i>	cocobacilo gram (-)	+	+	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	cocobacilo gram (-)	-	+	+	-

5. Envío y almacenamiento de la cepa
 - 5.1. Almacenamiento de la cepa en BHI+glicerol al 10% y en solución de PBS a una temperatura de -70°C.
 - 5.2. Resiembra en un nuevo medio de Regan Lowe para el envío a Guayaquil, para su confirmación y notificación de caso.

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras nasofaríngeas

Kit comercial: High Pure PCR Template Preparation Kit

Uso: Obtención de ADN bacteriano para PCR en tiempo real

Tipo de muestra: Hisopado/Aspirado nasofaríngeo suspendido en PBS

Lista de reactivos contenidos en el Kit

1. Tissue-lysis Buffer (1)	Tapa blanca
2. Binding Buffer (1)	Tapa verde
3. Proteinase K, lyophilizate (1)	Tapa rosada
4. Washing Buffer (1)	Tapa celeste
5. Inhibitor Removal Buffer (1)	Tapa negra
6. Elution Buffer (1)	Tapa transparente

Nota: Todas las soluciones son claras y no deben usarse cuando éstas se encuentren precipitadas. Se debe calentar la solución entre +15°C a +25°C o a 37°C en baño maría hasta que el precipitado se disuelva.

Lista de reactivos adicionales

1. Etanol absoluto
2. Isopropanol absoluto

Preparación de soluciones de trabajo

Reactivo	Reconstitución/Preparación	Almacenamiento
Proteinasa K (vial3; Tapa rosada)	Disolver en 4,5mL de H ₂ O destilada y mezclar bien Preparar alícuotas de 40 µL	Almacenar las alícuotas de -5°C a -25°C
Inhibitor Removal Buffer (vial 5; Tapa negra)	Añadir 20 mL de etanol absoluto y mezclar bien (rotular con fecha)	Almacenar las alícuotas de +5°C a +25°C Estable hasta Julio 2018
Buffer de lavado (Vial 5; Tapa celeste)	Añadir 40 mL de etanol absoluto a cada frasco y mezclar bien (rotular con fecha)	Almacenar las alícuotas de +5°C a +25°C Estable hasta Julio 2018

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Pasar por vortex cada muestra (suspensión de HNF derecho e izquierdo), por 1 minuto.
2. Trasvasar la suspensión del HNF derecho a la suspensión del HNF izquierdo.
3. Centrifugar a 13,500 RPM por 5 minutos.
4. Desechar el sobrenadante hasta obtener un volumen superior a 200 μ L.
5. Pasar por vortex por 3 minutos, hasta homogenizar completamente.
6. Trasvasar 200 μ L del tubo primario a un tubo eppendorf estéril. (Punto de partida para la extracción). Almacenar a -20°C .
7. Esterilizar la cabina de bioseguridad para iniciar el proceso de extracción.

Antes de iniciar tomar en cuenta lo siguiente:

1. Dejar armando y rotulando las columnas, insertar el tubo con filtro en el tubo de colección.
2. Preparar los tubos eppendorf para el ADN, rotulado con el código respectivo.
3. Tener el material necesario (pipetas, puntas, tubos falcon, tubos de 1,5 ml, marcadores) y esterilizar con luz UV por 10 minutos.

LISIS DE LA MUESTRA Y ADN BINDING

1. 200 μ L de la muestra más 5 μ L de lisozima e incubar a 37°C por 15 minutos.
2. Añadir 200 μ L de Binding Buffer más 40 μ L de Proteinasa K.
3. Mezclar inmediatamente por vortex e incubar a $+70^{\circ}\text{C}$, durante 10 minutos.
4. Añadir 100 μ L de Isopropanol y mezclar bien por vortex.
5. Pasar el volumen de la muestra dentro de la columna (ver la nota).
6. Centrifugar por 1 minuto a 11,100 rpm

LAVADO Y ELUCIÓN

7. Después del centrifugado, descartar el tubo de colección y colocar un nuevo tubo de colección.
8. Añadir 500 μ L de Inhibitor Removal Buffer (tapa negra)
9. Centrifugar por 1 minuto a 11,100 rpm
10. Descartar el tubo de colección y colocar un nuevo tubo de colección.
11. Añadir 500 μ L del Wash Buffer (tapa azul)

- 12.** Centrifugar por 1 minuto a 11,100 rpm
- 13.** Descartar el tubo de colección y colocar un nuevo tubo de colección.
- 14.** Añadir 500 µL del Wash Buffer (tapa azul)
- 15.** Centrifugar por 1 minuto a 11,100 rpm y descartar sólo el líquido del tubo colector.
- 16.** Centrifugar por 10 segundos a máxima velocidad, 14,000 rpm. (Este paso adicional de centrifugado permite remover el residuo de Wash Buffer).
- 17.** Descartar el tubo de colección y colocar sobre un tubo eppendorf estéril para el ADN.
- 18.** Añadir 200 µL de Buffer de Elución (tapa transparente), precalentado a +70°C a cada muestra.
- 19.** Centrifugar por 1 minuto a 14,000 rpm
- 20.** Desechar el filtro de la columna.
- 21.** Almacenar el tubo eppendorf que contiene el ADN a -20°C y sellar con papel parafilm.

Anexo 4. Protocolo de amplificación para la detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* mediante PCR en tiempo real

ETAPA I: Preparación de reactivos

1. Limpieza de la cabina de bioseguridad con alcohol y ARNasas (área blanca)
2. Colocar el material necesario

N°	Material	Estado
1	Puntas de 0,2-10 µL	
2	Puntas de 2-20 µL	
3	Puntas de 20-200 µL	
4	Guantes 2 pares	
5	Tubos de 600 µL y tubos de PCR	
6	Marcador Sharpie	
7	Agua molecular marca Promega (RAM)	
8	Gradillas, frasco cortopunzante	

3. UV durante 20 min. Nota: No se debe trabajar con luz
4. Preparación de la master mix Roche (Taq Man):
 - 4.1. Descongelar un vial 1B (tapa transparente) “Reaction mix”.
 - 4.2. Brevemente centrifugar el vial 1B (tapa transparente) “Reaction mix” y el vial 1A (tapa roja) “Enzyme”, luego colocar los viales de nuevo en hielo.
 - 4.3. Pipetear 60 µL del vial 1B (tapa transparente) al 1A (tapa roja).
 - 4.4. Mezclar pipeteando de arriba abajo (no vortex).
 - 4.5. Re identificar el vial 1A (tapa roja) con el nuevo rótulo que viene en el kit (vial 1: LightCycler FastStart DNA Master HybProbe y almacenar a -20°C.
5. Añadir 66 µL de Agua molecular al tubo de tapa verde (primers, sondas), homogenizar con pipeteo, dejar reposar por 15 minutos y realizar 2 alícuotas.
6. Añadir 66 µL de Agua molecular al tubo de tapa blanca (primers, sondas y DNA de IC), homogenizar con pipeteo, dejar reposar por 15 minutos y realizar 2 alícuotas.
7. Añadir 40 µL de Agua molecular a cada estándar y mezclar pipeteando 10 veces de arriba abajo para homogenizar (realizar 4 alícuotas de 10 µL).
8. Añadir 40 µL de Agua molecular al tubo de tapa transparente (control +) y mezclar pipeteando 10 veces de arriba abajo, concentración final: 10^5 por cada 5 µL (evitar descongelar a repetición, se recomienda realizar alícuotas)

9. Almacenar los reactivos a -20°C

ETAPA II: Preparación de Master Mix

1. Limpieza de la cabina de bioseguridad con alcohol y ARNasas (área blanca)
2. Colocar el material necesario

N°	Material	Estado
1	Puntas de 0,2-10 µL	
2	Puntas de 2-20 µL	
3	Puntas de 20-200 µL	
4	Guantes 2 pares	
5	Tubos de 600 µL	
6	Marcador Sharpie	
7	Agua molecular marca Promega	
8	Gradilla refrigerada	
9	Frasco cortopunzante	

3. UV durante 20 min
4. Determinar el número de muestras a procesar.
5. Realizar cálculos para preparación de la Master Mix según el volumen de muestras.

Reactivos	Presentación	1xxx
H ₂ O grado molecular	Tapa transparente (2)	6.6		
Mg ²⁺	Tapa azul (1)	2.4		
Primers y sondas	Tapa verde (reconstituido)	2.0		
IC	Tapa blanca (reconstituido)	2.0		
Master ROCHE (TaqMan)	Tapa Roja (vial 1) (preparado)	2.0		
ADN	Tubo eppendorf	5.0		
TOTAL		20 µL		
Nota: El IC se puede sustituir con 2 µL de agua molecular.				

6. Homogenizar correctamente, spin y transferir 15 µL para cada pocillo a utilizar

ETAPA III: Dispensar ADN

1. Limpieza de la cabina de flujo laminar con alcohol y ARNasas (Laboratorio de Influenza INSPI)
2. Colocar el material necesario

N°	Material	Estado
1	Puntas de 0,2-10 µL	
2	Puntas de 2-20 µL	
3	Puntas de 20-200 µL	
4	placa de PCR	
5	Sellador FLU	
6	Sellante (plástico)	
7	Guantes	
8	Marcador Sharpie	
9	Agua molecular FLU	

1. Preparar los ADN para dispensar
2. Añadir 5 µL de ADN de muestra, STD o controles
3. Dispensar según el siguiente rotulado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

4. Una vez dispensado el ADN, sellar la placa y asegurar.
5. Colocar en hielo hasta introducir en el equipo.

Anexo 5. Formulario de notificación y cierre de caso EPI 1 individual del MSP (Anverso)

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
DIRECCIÓN NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA
NOTIFICACIÓN Y CIERRE DE CASO

SIVE - ALERTA
EPI 1 - Individual

SEMANA EPIDEMIOLÓGICA

I. Datos notificación	1. Institución	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>MSP IESS FFAA POLI JBG MEC DRS PRIV ONG</div> <div></div> </div>	2. Nombre Unidad que notifica:			
	3. Ubicación Unidad	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>Provincia</div> <div>Cantón</div> <div>Parroquia</div> </div>				
	4. Fecha de atención	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div> <div> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div> </div>				
II. Datos del paciente	6. Nombre	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div> <div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div> </div>		7. No. de documento de identificación	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div>	
	8. Número de Expediente / Historia clínica	_____		9. Nacionalidad	_____	
	10. Sexo	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <div><input type="checkbox"/></div> <div>Hombre</div> </div> <div> <div><input type="checkbox"/></div> <div>Mujer</div> </div> </div>		11. Fecha de nacimiento:	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div> <div> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div> </div>	
	12. Edad en:	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <div>_____</div> <div>Años</div> </div> <div> <div>_____</div> <div>Meses</div> </div> <div> <div>_____</div> <div>Días</div> </div> </div>				
	13. Lugar residencia:	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>Provincia</div> <div>Cantón</div> <div>Parroquia</div> </div>				
	14. Dirección exacta	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>Barrio, localidad</div> <div>Telf: _____</div> </div>				
III. Datos Clínicos	15. Lugar probable de infección:	_____				
	16. Fecha de inicio de síntomas	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div>		17. Diagnóstico inicial:	_____	
	18. Embarazada :	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>Si <input type="checkbox"/></div> <div>No <input type="checkbox"/></div> </div>		19. Semanas de Gestación:	_____	
IV. Análisis para laboratorio	20. Muestra de laboratorio	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>Si <input type="checkbox"/></div> <div>No <input type="checkbox"/></div> </div>		21. Tipo de muestra	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div>	
	22. Nombre y ubicación del laboratorio	_____		23. Tipo de muestra	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div>	
			<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div>			
V. Laboratorio	24. Resultado		<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <div>Positivo <input type="checkbox"/></div> <div>Negativo <input type="checkbox"/></div> <div>Dudoso <input type="checkbox"/></div> </div> <div>25. Resultado (agente)</div> </div>		<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>1. _____</div> <div>2. _____</div> </div>	
	Observaciones:		_____			
	26. Se realizó investigación		<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>Si <input type="checkbox"/></div> <div>No <input type="checkbox"/></div> </div>			
VI. Investigación de caso	27. Fecha de investigación	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div>		28. Nº Contactos sintomáticos	_____	
	29. Evolución del caso	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <div>Ambulatorio <input type="checkbox"/></div> <div>Hospitalización <input type="checkbox"/></div> <div>UCI <input type="checkbox"/></div> </div> <div></div> </div>		30. Condición final del caso	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <div>Vivo <input type="checkbox"/></div> <div>Con Discapacidad <input type="checkbox"/></div> <div>Muerto <input type="checkbox"/></div> </div> <div></div> </div>	
VIII. Cierre caso	31. Fecha de fallecimiento	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div>		32. Clasificación final caso:	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <div>Confirmado <input type="checkbox"/></div> <div>Descartado <input type="checkbox"/></div> <div>No concluyente <input type="checkbox"/></div> </div> <div></div> </div>	
	33. Confirmado por	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <div>Laboratorio <input type="checkbox"/></div> <div>Clínico <input type="checkbox"/></div> <div>Nexo epid. <input type="checkbox"/></div> </div> <div></div> </div>		34. Diagnóstico final	_____	
	35. Fecha cierre caso	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>_____</div> <div>_____</div> <div>_____</div> </div>		36. Nombre responsable epid.:	_____	

OBSERVACIONES:

1. Formulario con 3 copias una original y dos copias químicas con la siguiente distribución
Original para seguimiento de Epidemiólogo
Copia 1 funciona como pedido de laboratorio
Copia 2 Historia clínica
2. a. En el aplicativo Informático estos datos son generados automáticamente por el sistema, al momento del Ingreso de datos.

(Anverso)

Grupo	Nombre		Código CIE-10	*Diagnóstico como llega a la sospecha
Síndromes	Diarreico agudo con deshidratación grave u otras complicaciones		U.50	Clínico
	Febril eruptivo no vesicular (exantemático) EFENV		R.21	Clínico
	Febril Ictérico agudo		U.51	Clínico
	Febril Hemorrágico Agudo		U.53	Clínico
	Febril Ictérico hemorrágico Agudo			Clínico
	Meningeo Encefálico		G04.9	Clínico
	Parálisis flácida aguda		U.54	Clínico
	Infecciones respiratorias agudas bajas graves inusitadas			Clínico
Grupo	Enfermedad		Código CIE-10	*Diagnóstico como cierra el caso
Inmunoprevenibles	Difteria		A36.0 <-> A36.9	Laboratorio - *nexo epidemiológico
	Meningitis Meningocócica		A39.0† (G01*)	Laboratorio - *nexo epidemiológico
	Poliomielitis Aguda		A80.0 <-> A80.9	Laboratorio
	Rubéola		B06.0† <-> B06.9	Laboratorio - *nexo epidemiológico
	Rubéola congénita		P 35.0	Clínico
	Sarampión		B05.0† <-> B05.9	Laboratorio - *nexo epidemiológico
	Tétanos Neonatal		A33	Clínico
	Tosferina		A37.0 <-> A37.9	Laboratorio - *nexo epidemiológico
Zoonóticas	Brucelosis		A23.0 <-> A23.9	Laboratorio - *nexo epidemiológico
	Leptospirosis		A27.0 <-> A27.9	Laboratorio - *nexo epidemiológico
	Meningitis Eosinofílica		B83.2	Laboratorio
	Peste		A20.0 <-> A20.9	Laboratorio
	Rabia	Contactos con y exposición de Rabia	Z20.3	Clínico
		Rabia Humana Urbana	A82.1	Laboratorio
		Rabia Humana Selvática	A82.0	Laboratorio
Transmitidas por vectores (ETV)	Chagas	Agudo	B57.0 <-> B57.1	Laboratorio
		Crónico	B57.2 <-> B57.5	Laboratorio
	Dengue	con signos de alarma	A90	Laboratorio
		Grave	A91	Laboratorio
	Fiebre Amarilla		A95.0 <-> A95.9	Laboratorio
	Leishmaniasis Mucocutánea		B55.2	Laboratorio
	Leishmaniasis Visceral		B55.0	Laboratorio
	Oncocercosis		B73	Laboratorio
	Malaria	Malaria no complicada por <i>Plasmodium Vivax</i>	B51.9	Laboratorio
		Malaria no complicada por <i>Plasmodium Falciparum</i>	B50.0	Laboratorio
		Malaria Complicada por <i>Plasmodium Falciparum</i>	B50.0 <-> B50.9	Laboratorio
ETAS	Cólera		A00.0 <-> A00.9	Laboratorio - *nexo epidemiológico
Eventos en Salud Pública de Importancia Internacional	Evento inusitado			Laboratorio
	Ántrax		A22.0 <-> A22.9	Laboratorio
	Ébola		A98.4	Laboratorio
	Encefalitis	del Nilo Occidental	A92.3	Laboratorio
		Equina Venezolana	A92.2	Laboratorio
		Equina del Este	A83.2	Laboratorio
	Fiebre de Lassa		A96.2	Laboratorio
	Hantavirus		A98.5† - B 33.4† (J17.1*)	Laboratorio
	Influenza debida a virus de la influenza de origen aviar y de otro origen animal		J09	Laboratorio
	Síndrome Respiratorio Agudo Severo		U 04	Laboratorio
	Viruela		B03	Laboratorio
Efecto tóxicos	Efecto tóxico por alcohol metílico		T51.1	Clínico - Laboratorio
	Intoxicación de plaguicidas		T60.0 <-> T60.9	Clínico - Laboratorio
	Mordedura de serpientes		T63.0	Clínico
Enfermedades Respiratorias	Tuberculosis	Tuberculosis del pulmón, confirmada por hallazgo microscopico del Bacilo Tuberculoso en esputo con o sin cultivo.	A15.0	Laboratorio
		Tuberculosis del pulmón, confirmada unicamente por cultivo.	A 15.1	Laboratorio
		Tuberculosis del pulmón, con examen bacteriológico e histológico negativo	A16.0	Clínica

Todos estos síndromes y enfermedades requieren la aplicación de la Ficha de investigación.
Se utilizará el nexo epidemiológico de acuerdo a la definición de caso de cada enfermedad.

Anexo 6. Modelo de formulario para la vigilancia de tosferina

INFORMACIÓN DEL PACIENTE

Nombre:	Sexo:	Fecha de nacimiento:	Etnia:
---------	-------	----------------------	--------

HISTORIA CLÍNICA DEL PACIENTE

Fecha de inicio del primer síntoma: __/__/__

¿Presencia de alguna de las siguientes complicaciones?

Ataques de apnea	SI __ NO __ NC __	Convulsiones	SI __ NO __ NC __
Hemorragia conjuntival	SI __ NO __ NC __	Neumonía	SI __ NO __ NC __
Muerte	SI __ NO __ NC __	SI, Fecha de muerte	__/__/__

Indicar si el paciente es:

__ Diagnosticado de enfermedad respiratoria crónica (incluida asma)

__ Diabético

__ Diagnosticado de enfermedad cardíaca crónica

__ Embarazada

__ Inmunocomprometido

__ Diagnosticado de otra condición. Por favor, especificar _____

¿El paciente fue ingresado en el hospital?

SI __ NO __ NK __

Fecha de ingreso: __/__/__

SI, ¿En qué hospital? _____

Fecha de alta: __/__/__

HISTORIA DE VACUNACIÓN DEL CASO. Favor completar la tabla cuanto le sea posible

¿Cuántas fueron las dosis de la vacuna de tos ferina antes de la aparición de los síntomas?

1 __ 2 __ 3 __ 4 __ NC __

	Fecha de la vacunación	Nombre comercial	Fabricante	Número de lote
1ra dosis				
2da dosis				
3ra dosis				
4ta dosis				

INFORMACIÓN MATERNA

Fecha de nacimiento: __/__/__

Paridad (a término e incluido este parto):

Semanas de gestación al parto:

¿Fue la madre vacuna contra tos ferina durante este parto?

SI __ NO __ NC __

SI, Indique el número de semanas de gestación al momento de vacunación:

Fecha de vacunación: __/__/__

Nombre comercial/ fabricante:

N° de lote:

¿El paciente ha tenido contacto con algún caso o sospechoso de Tosferina en el mes antes del inicio de los síntomas?

1. Algún contacto confirmado de pertussis

SI __ NO __ NK __

SI, ¿Dónde sucedió el contacto?

Casa __

Patio de juegos __

Escuela __

Trabajo __

Hospital __

Otro __

SI, ¿Quién fue el contacto?

Madre __

Padre __

Hermano __

Otro __

2. ¿Qué edad tenía el/los contacto/s (años)?

<1 __

1- 4 __

5-9 __

10-14 __

15-44 __

>45 __

Completado por (favor escribir en letra imprenta):

Fecha:

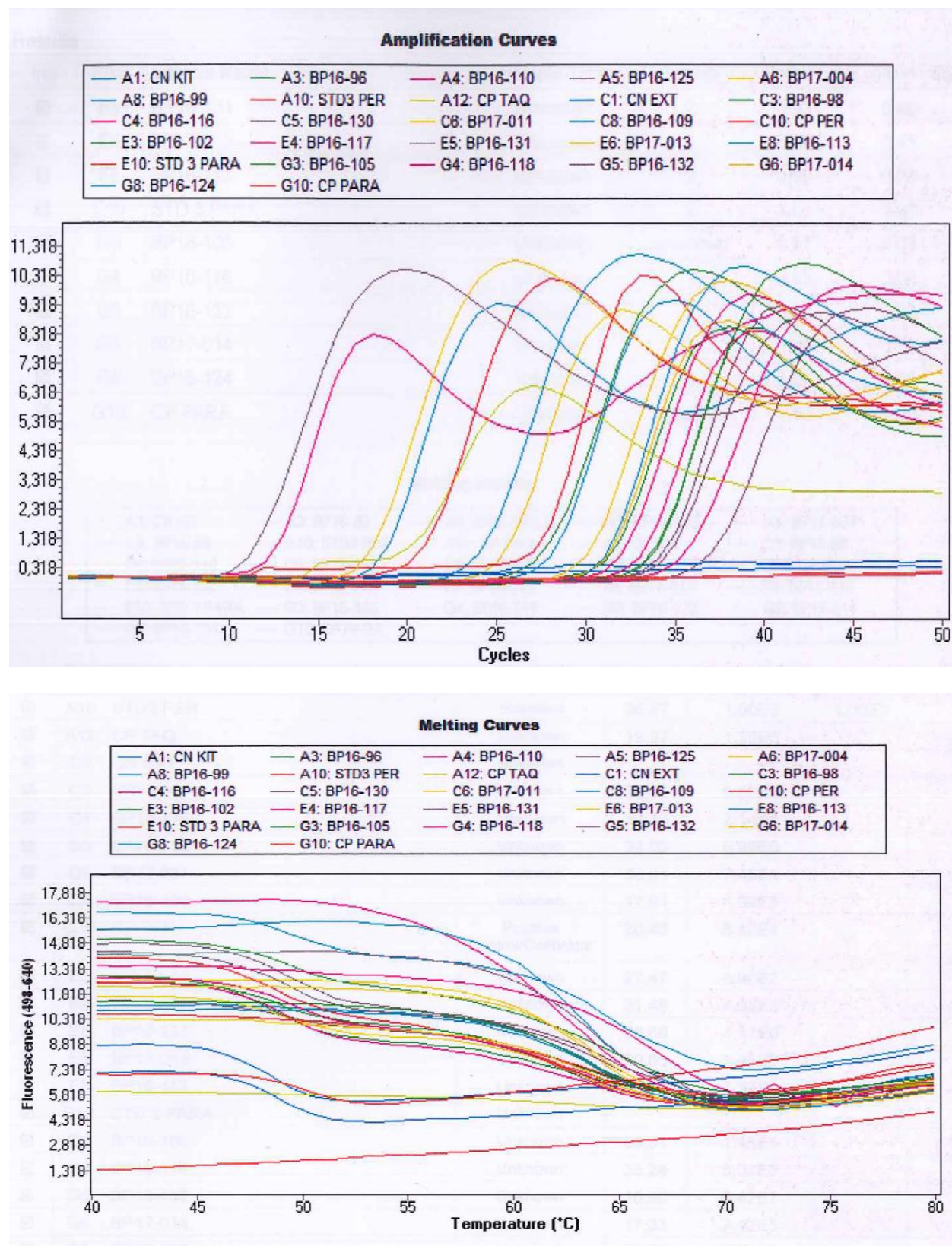
Número de teléfono:

Posición/ cargo:

Fuente: Public Health England, 2016

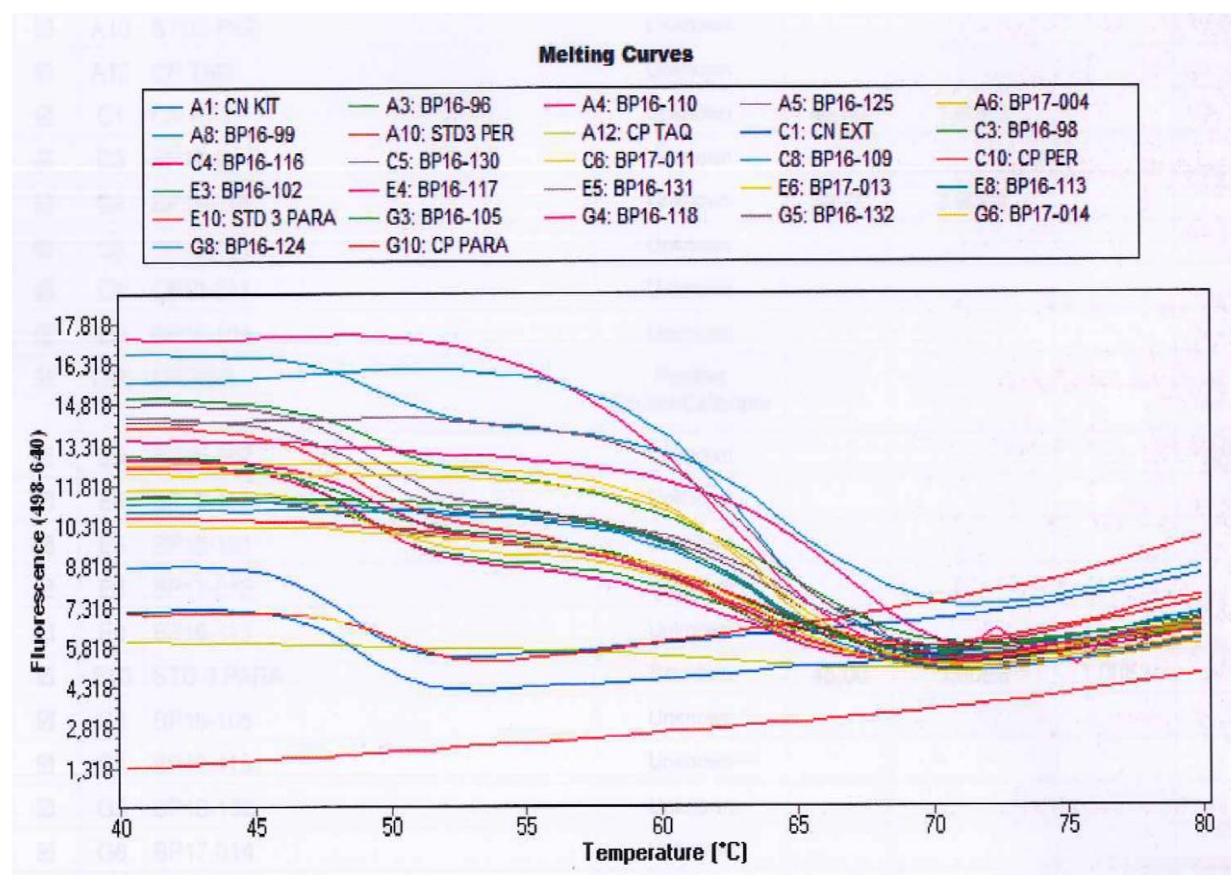
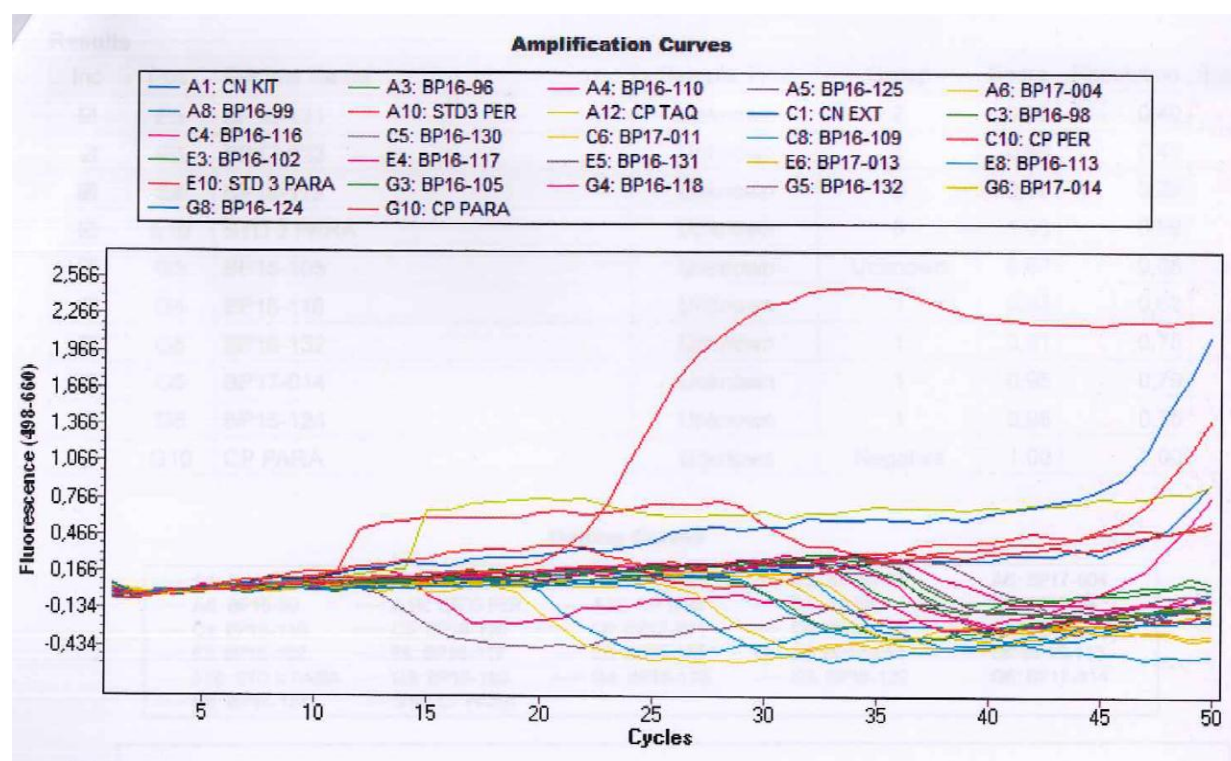
Anexo 7. Experimentos de la amplificación por PCR en tiempo real en el LightCycler 480 II

EXPERIMENTO N° 1



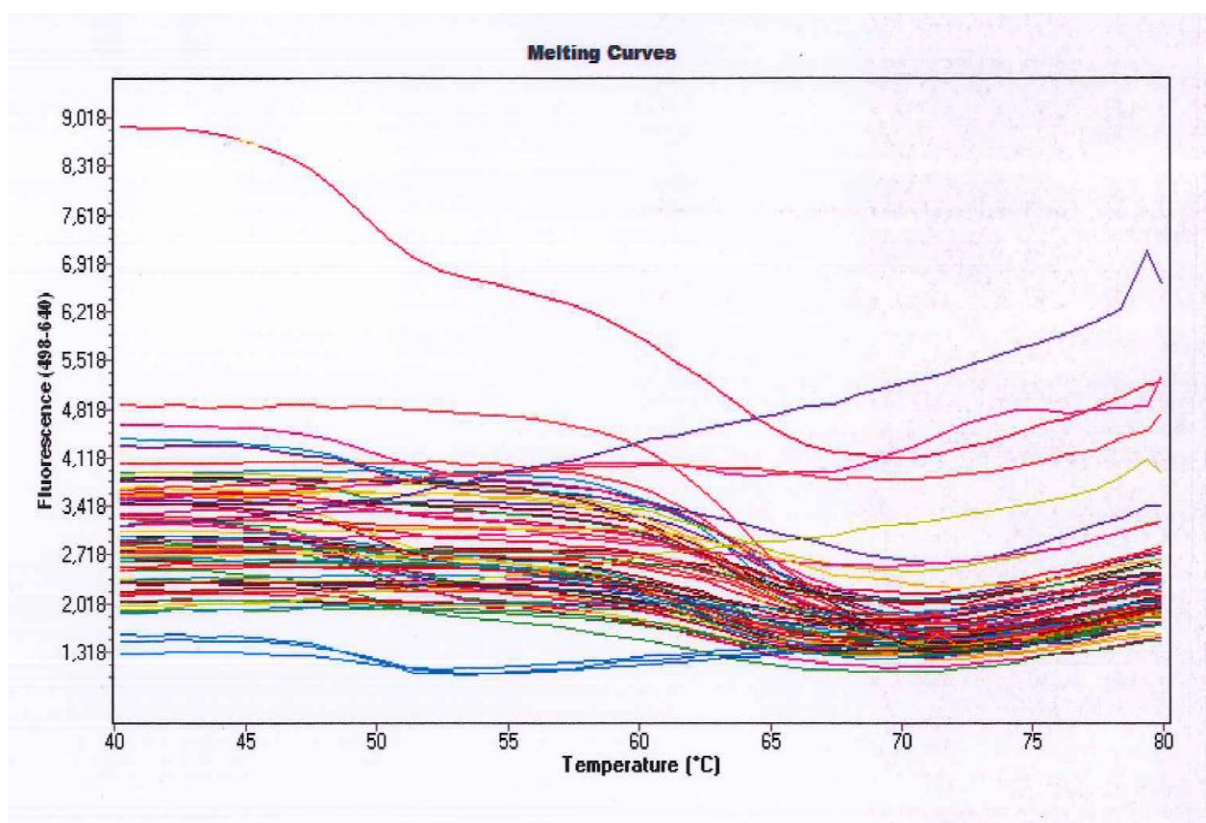
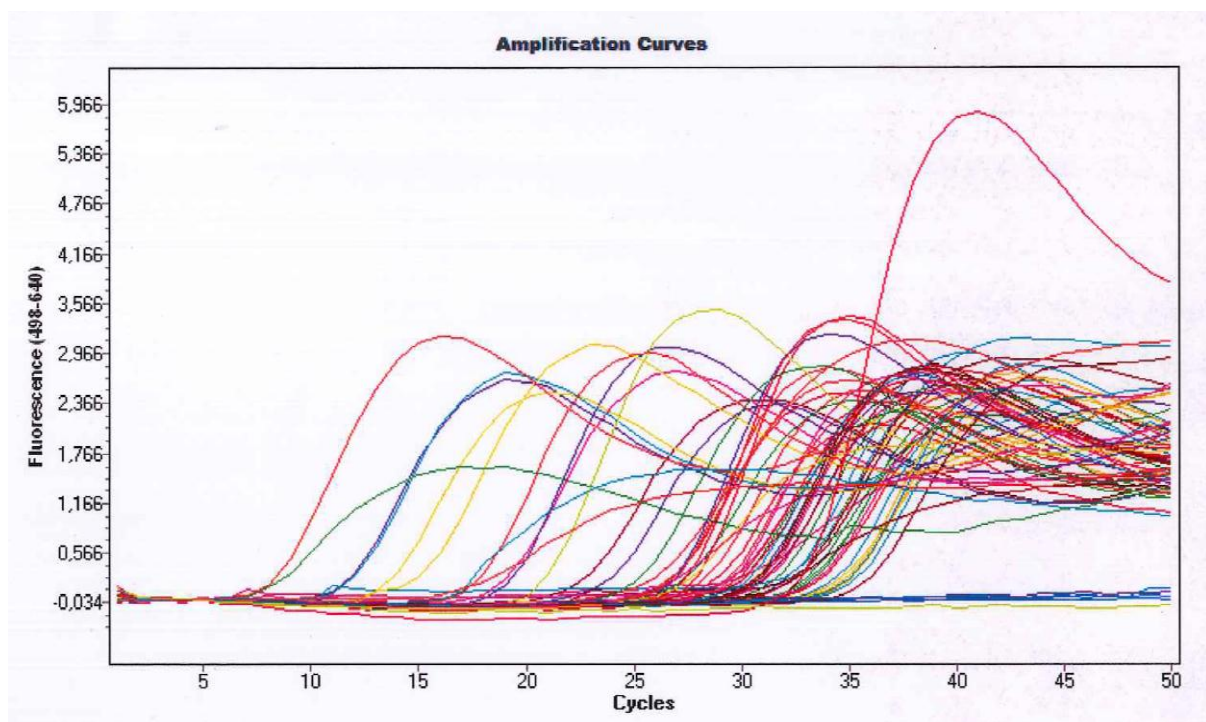
Filtro 498-640

EXPERIMENTO N° 2



Filtro 498-660

EXPERIMENTO N° 3



Filtro 498-640